

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, G01N 21/76	A1	(11) 国際公開番号 WO00/01848  (43) 国際公開日 2000年1月13日(13.01.00)
---------------------------------------	----	---

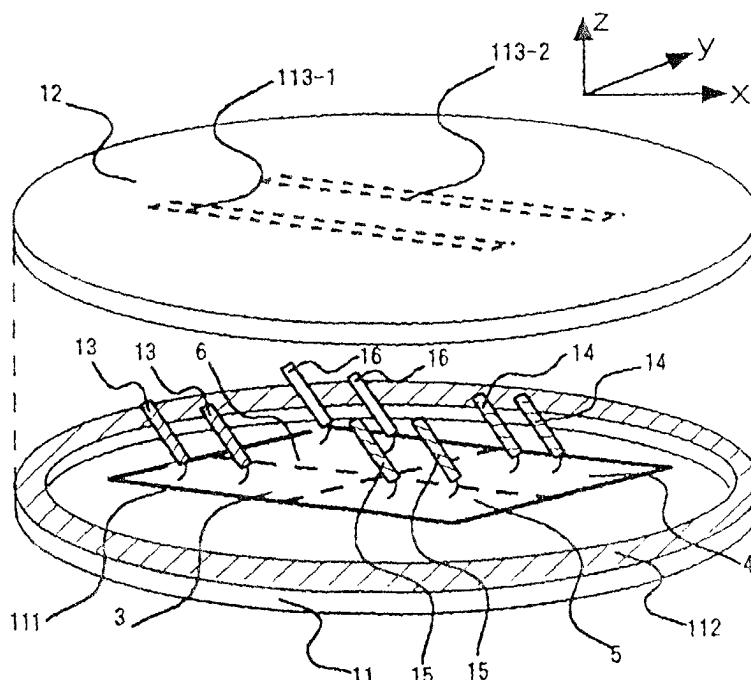
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02963</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月1日(01.07.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 日立製作所(HITACHI, LTD.)(JP/JP) 〒101-8010 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 梶山智晴(KAJIYAMA, Tomoharu)(JP/JP) 宮原裕二(MIYAHARA, Yuji)(JP/JP) 富田裕之(TOMITA, Hiroyuki)(JP/JP) 岡野和宣(OKANO, Kazunori)(JP/JP) 〒185-8601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 小川勝男(OGAWA, Katsuo) 〒100-8220 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 株式会社 日立製作所内 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
---	---

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE ASSAY APPARATUS AND POLYNUCLEOTIDE ASSAY METHOD

(54) 発明の名称 ポリヌクレオチド検査装置及びポリヌクレオチド検査方法

(57) Abstract

A polynucleotide assay method with the use of a polynucleotide detection cell provided with a first electrode (111) containing DNA probes (13, 14, 15, 16) fixed to respective different compartments (3, 4, 5, 6) and second electrodes (113-1, 113-2) opposite to the first electrode. The method comprises capturing a target polynucleotide by complementary strand binding between each DNA probe fixed to each compartment and the target polynucleotide, conducting an elongation reaction by using a base (dNTP) labeled with electrochemiluminescence to elongate the DNA probe bonded by complementary strand binding, and detecting electrochemiluminescence created by applying a voltage across the first electrode and the second electrodes to detect whether or not an elongated chain produced by the elongation reaction is present. The DNA detection cell having a simple constitution and an assay apparatus using the same serve to quickly detect a hybrid of a target DNA fragment with a DNA probe and to assay a large amount of probes in a short time.



(57)要約

DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の電極(111)と、第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2)とを具備するポリヌクレオチド検出セルを使用し、区画に固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとの相補鎖結合により、標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(dNTP)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合したDNAプローブを伸張し、第1の電極と第2の電極との間に電圧を印加して生じる電気化学発光を検出し、伸張反応により生成した伸張鎖の有無を検出する。本発明の単純な装置構成のDNA検出セル及びこれを用いる検査装置では、標的DNA断片とDNAプローブとのハイブリッドの高速検出が可能であり、大量のプローブ検定を短時間にできる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TH	タイ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## ポリヌクレオチド検査装置及びポリヌクレオチド検査方法

## 技術分野

本発明は、DNA、mRNA等を検出して検査を行なうためのポリヌクレオチド検出セル及びこれを用いる検査装置、及び検出方法に関する。

## 背景技術

16000プローブを固定したDNA検出セルを用いて、蛍光標識された標的DNAとプローブとのハイブリッドを形成し、共焦点顕微鏡を使用してDNA検出セルの全域を15分以下でレーザ光走査して蛍光標識を励起し、生じる蛍光を検出することにより、ハイブリッドを検出する技術が知られている(Nature Biotechnology 14, 1675-1680 (1996))。

試料DNAをビオチン基で修飾しビオチン-アビジン結合により、試料DNAをビーズに捕捉し、電気化学発光標識した既知の塩基配列を持つDNAプローブと試料DNAとの相補鎖結合を行ない、ビーズ表面での電気化学発光を検出して相補鎖結合の有無を検出する、電気化学発光標識したDNAプローブを使用するプローブ法が報告されている(Clinical Chemistry 37, No. 9, 1626-1632 (1991))。

電気化学的発光(ECL)標識ヌクレオチド、電気化学的発光(ECL)標識で標識されたオリゴが知られている(特表平9-505464号公報)。なお、電気化学発光反応に使用される各種の錯体が広く知られている(Clinical Chemistry 37, No. 9, 1534-1539 (1991)), J. Electrochem. Soc., Vol. 132, No. 4, 842-849 (1985), 特開平7-173185号公報, 特開平7-309836号公報)。

### 発明の開示

上記の従来技術では、DNA検出セルのプローブが固定された16000にも及ぶ多数の部位をレーザ光走査するために、上記の従来技術を臨床分野での診断技術として日常的に適用するには、ハイブリッドの検出のスループットが十分でないという問題があった。

本発明の目的は、標的ポリヌクレオチドとプローブとのハイブリッドの高速な検出を行なうポリヌクレオチド検出セル及びこれを用いるポリヌクレオチド検出装置、及び検査方法を提供することにある。

本発明のポリヌクレオチド検出セルでは、複数の区画に異なるDNAプローブが固定された作用電極が形成されたDNA検出セル下基板と、所定の形状のカウンター電極が形成された透明なDNA検出セル上基板との間に、化学反応、電気化学発光反応に関与する試薬溶液が保持される空間が構成される。

本発明のポリヌクレオチド検出セルを用いる検査装置では、標的DNA断片（標的ポリヌクレオチド）と各区画に固定されたDNAプローブとの間のハイブリッドのDNAプローブの伸張反応を行ない、伸張鎖の検出を電気化学発光反応を用いて行なう。

本発明の検査装置では、作用電極とカウンター電極との間に印加する電圧の高速な制御により、電気化学発光反応の進行及び停止を高速に制御するので、各区画で形成される伸張鎖の有無を高速に検出できる。即ち、単純な装置構成で多量のプローブ検定を短時間にできる。

本発明の検査装置では、まず、DNA試料から得るDNA断片群と各区画に固定されたDNAプローブとを相補鎖反応させて、各区画にDNA断片を捕捉する。次いで、電気化学発光標識を結合したアデニン、チミン、グアシン、シトシンとTaq DNAポリメラーゼを用いて伸張反応を行ない、各区画に捕捉されたDNA断片に相補鎖結合したDNAプローブを伸張させて、電気化学発光標識を結合したdNTP（N=A, T, G, C）を伸張鎖に取

り込む。DNA検出セルに還元剤を導入して、作用電極とカウンター電極との間に電圧を印加して、作用電極の表面及びその近傍で生じる電気化学発光を測定する。電気化学発光の生じる区画の位置と電気化学発光の強度の検出は、光ファイバー等の光伝達手段と固体光検出器との組合せ、光増幅を行なうマイクロチャンネルプレートとTVカメラ等の組合せ等により、作用電極の区画毎に分離して行なう。

また、本発明の検査装置では、作用電極の選択された区画とカウンター電極との間の局所部位に電圧を印加するポリヌクレオチド検出セルを集積化して構成して、各局所部位で生じる電気化学発光を測定することにより、選択された区画に固定されたDNAプローブと相補鎖結合する標的DNA断片の有無を迅速に検出できる。

本発明の検査装置では、電気化学発光標識を結合したプライマを使用して、標的DNA断片をPCRにより増幅して得たDNA断片群、電気化学発光標識を結合したオリゴマーをライゲーション反応により各DNA断片に結合して得るDNA断片群を使用できる。この場合、電気化学発光標識を結合していないアデニン、チミン、グアシン、シトシンとTaq DNAポリメラーゼを用いて、DNA断片に相補鎖結合するDNAプローブの伸張反応を行なう。

本発明の検査方法の第1の構成では、異なるDNAプローブが種類毎に異なる区画に固定された第1の電極と、第1の電極に対向する第2の電極とを具備するポリヌクレオチド検出セルの区画に固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合させて、標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、相補鎖結合したDNAプローブを電気化学発光標識した塩基を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合したDNAプローブを伸張する工程と、第1の電極と第2の電極との間に電圧を印加する工程と、電圧の印加により生じる電気化学発光の有無を検出して伸張反応により生成した伸張鎖の有無を検出する工程とを有することに特徴がある。

本発明の検査方法の第2の構成では、異なるDNAプローブが種類毎に異

なる区画に固定された第1の電極と、第1の電極に対向する第2の電極とを具備するポリヌクレオチド検出セルの区画に固定されたDNAプローブと、電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチドを結合した標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合させて、標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、第1の電極と第2の電極との間に電圧を印加して、電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する工程とを有することに特徴がある。

本発明の検査方法の第3の構成では、異なるDNAプローブが種類毎に異なる区画に固定された第1の電極と、第1の電極に対向する第2の電極とを具備するポリヌクレオチド検出セルの区画に固定されたDNAプローブと、電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合させて、標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、第1の電極と第2の電極との間に電圧を印加して、電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する工程とを有することに特徴がある。

本発明の構成では、電気化学発光を利用するので、蛍光標識を用い励起光により蛍光標識を励起する従来技術の構成に比較して、光学系、光検出器を単純な構成によりDNA検出セルに近接させることができ、電気化学発光の利用効率を最大限に高めることが可能となる。

本発明のDNA検出セル、及び検査装置によれば、非常に多種類のDNAプローブを使用しても、検査に要する時間は短時間で済み、検査の高速化できる。電気化学発光の測定系に機械的、光学的な可動要素を必要としないため、取り扱いや調整が簡単化できる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の第1の実施例のDNA検出セルの構成を示す図である。  
第2図は、本発明の第1の実施例に於いて、DNA検出セルの区画に固定されたDNAプローブと標的DNA断片の一部の塩基配列との相補鎖結合によるハイブリッドを示す図である。

第3図は、本発明の第1の実施例に於いて、伸長反応で使用するルテニウム

錯体を結合した d A T P を示す図である。

第 4 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、伸長反応で使用するルテニウム錯体を結合した d C T P を示す図である。

第 5 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、伸長反応で使用するルテニウム錯体を結合した d G T P を示す図である。

第 6 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、伸長反応で使用するルテニウム錯体を結合した d T T P を示す図である。

第 7 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、標的 D N A 断片に相補鎖結合した D N A プローブの伸長反応を説明する図である。

第 8 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、電気化学発光の検出系の例を示す図である。

第 9 図は、本発明の第 1 の実施例に於いて、検出結果を示す表示画面の例を示す図である。

第 1 0 図は、本発明の第 2 の実施例に於いて、D N A 検出セル作用電極の近傍での電気化学発光を T V カメラを用いて測定する検査装置の構成例を示す図である。

第 1 1 図は、本発明の第 3 の実施例に於いて、作用電極とカウンター電極とを同一平面に形成した D N A 検出セルの構成を示す図である。

第 1 2 図は、本発明の第 4 の実施例に於いて、作用電極と複数の独立したカウンター電極とを同一平面に形成した D N A 検出セルの構成を示す図である。

第 1 3 図は、本発明の第 4 の実施例に於いて、複数の区画からの電気化学発光を集光して検出する光学系を説明する図である。

第 1 4 図は、本発明の第 5 の実施例に於いて、D N A 検出セルの区画からの電気化学発光を T V カメラにより検出する場合の T V カメラの撮像面で観察される区画の大きさと撮像素子の大きさの関係を説明する図である。

第 1 5 図は、本発明の第 5 の実施例に於いて、カウンター電極がマトリックス状の配線により接続され D N A セル下基板に形成される D N A 検出セルの構成を示す図である。

第16図は、本発明の第5の実施例に於いて、ゲート及び導線の選択により電気化学発光を誘起させる区画の選択を説明する図。

第17図は、本発明の第6の実施例に於いて、選択された区画で繰り返し電気化学発光を生じさせる電圧印加の例を説明する図である。

第18図は、本発明の第7の実施例に於いてDNAプローブとして使用する、2'-デオキシオリゴヌクレオチドの間にホスホロチオエート (phosphorothioate) 結合を持つオリゴヌクレオチドを説明する図である。

第19図は、本発明の第8の実施例であり、DNA検出セルを用いた検査装置の構成を示す図である。

第20図は、本発明の第8の実施例で使用するDNA検出セルの平面図である。

第21図は、本発明の第8の実施例に於いて、繰り返し電気化学発光を生成する電圧印加の例を説明する図である。

第22図は、本発明の第9の実施例に於いて、電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチドを結合した標的ポリヌクレオチドと相補鎖結合したDNAプローブを示す図である。

第23図は、本発明の第10の実施例に於いて、電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチドと相補鎖結合したDNAプローブを示す図である。

第24図は、本発明の第11の実施例であり、本発明の検査装置を用いた検査の手順を説明する図である。

第25図、第26図は、本発明の各実施例に使用可能な電気化学発光標識の構造、及び電気化学発光反応の例を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

第25図、第26図は、以下で説明する本発明の各実施例に使用可能な電気化学発光標識の構造、及び電気化学発光反応の例として、ルテニウム錯体（2種類）を使用する例を示す。



第25図は、ルテニウムトリビピリジル錯体 (ruthenium (II) tris-bipyridyl) (以下,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  と略記する) と、還元剤としてトリプロピルアミン (tripropylamine, TPA) を使用する電気化学発光反応の例を説明する図である (Clinical Chemistry 37, No. 9, 1534-1539 (1991) を参照)。ルテニウムトリビピリジル錯体 ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ ) は、中性溶液では+2価の状態 (基底状態) (参照番号201,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) で安定して存在する。TPA 202は、中性溶液ではほぼ安定して存在する。作用電極203の溶液に対する電位が約+1.1V以上になるように、作用電極とカウンター電極との間に電圧を印加すると、+2価の状態のルテニウムトリビピリジル錯体は作用電極の表面及びその近傍で酸化され、+3価の状態 (参照番号204,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ) となる。TPA 202も作用電極の表面及びその近傍で酸化され、+1価の励起状態のTPA (参照番号205) となる。第25図、第26図に示す★印は、励起状態を示す。+1価の励起状態のTPA (参照番号205) は、励起状態のまま脱プロトン化により中性の励起状態のTPA (参照番号206) となり、+3価の状態 (参照番号204,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ) に対し還元剤として働く。+3価の状態 (参照番号204,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ) は、励起状態のTPA (参照番号206) により還元され、+2価の励起状態 (参照番号207) となり、電気化学発光 (発光分布の中心波長は約620nmである) を伴って+2価の状態 (基底状態) (参照番号201,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) に戻る。第25図に示す電気化学発光反応では、ルテニウムトリビピリジル錯体は消費されずに繰り返し発光に関与する。

第26図は、ルテニウムトリフェナントロリン錯体 (ruthenium (II) tris-phenanthroline) ( $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$  と略記する) (参照番号211) と、還元剤としてTPAを使用する電気化学発光反応の例を説明する図である (Clinical Chemistry 37, No. 9, 1534-1539 (1991))。第25図と同

様の電気化学発光反応の経路により、電気化学発光（発光分布の中心波長は約590nmである）を生じる。

なお、第25図、第26図に示す電気化学発光標識の例の他に、特開平7-173185号公報、特開平7-309836号公報、J. Electrochem. Soc., Vol. 132, No. 4, 842-849 (1985)に記載の各種の発光性金属錯体標識が、本発明の検出装置に使用できる。

#### （第1の実施例）

第1図は、本発明の第1の実施例のDNA検出セルの構成を示す図である。第1の実施例のDNA検出セルは、第1図に示すz方向にDNA検出セル下基板11とDNA検出セル上基板12とをガスケット112を介して積層して構成される。DNA検出セル下基板11とDNA検出セル上基板12との間が、以下の説明で使用する、化学反応、電気化学発光反応に関与する試薬溶液が保持されるDNA検出セルを構成する。DNA検出セル下基板11の上面にAu製の所定の形状の作用電極111が形成されている。DNA検出セル上基板12は光透過性材料から構成され、下面に細長い形状を持つ平行に形成されたカウンター電極113-1、113-2が所定の形状で形成されている。カウンター電極113-1は区画4、6に対向し、カウンター電極113-2は区画3、5に対向している。

第1図に示す、DNA検出セル下基板11、DNA検出セル上基板12の外形は円形であるが、円形に限らず、正方形、長方形、多角形等の任意の形状でも良い。第1図に示す、作用電極111の形状は正方形であるが、形状は任意で良い。

複数種類のDNAプローブ（オリゴマー）が作用電極111の表面に予め固定しておく。第1図で鎖線で示すように、作用電極111の面は複数の区画に分けられており、区画aにはDNAプローブb、区画aにはDNAプローブb、…のように、各区画には異なる種類のDNAプローブが固定されている。第1図に示す作用電極111の区画の形状は、正方形であるが、形状

は任意で良い。カウンター電極 113-1 は、作用電極 111 の区画 3, 5 に対向し、カウンター電極 113-2 は、作用電極 111 の区画 4, 6 に対向している。なお、第 1 図では、作用電極 111, 及びカウンター電極 113-1, 113-2 の電圧印加線は省略している。なお、電気化学発光を効率良く検出するためには、カウンター電極 113-1, 113-2 は、透明電極とすることが望ましい。また、第 1 図に於いて、作用電極 111 と同じ面積を持つ透明なカウンター電極 113 を、カウンター電極 113-1, 113-2 の代りに使用して、作用電極 111 に対向させて配置してもよい。

第 1 の実施例では、ヒト由来 DNA ライブラリから選んだ 8.7 kb の DNA を、制限酵素 *Nla* III で切断した DNA 断片群を試料とし、各 DNA 断片を DNA プローブにより識別して検出する。以下では、配列番号 1 の塩基配列を持つ第 1 の DNA プローブ 13, 及び配列番号 2 の塩基配列を持つ第 2 の DNA プローブ 14 を使用して、第 1, 第 2 の DNA プローブにそれぞれ相補鎖結合する DNA 断片を検出する例をとって説明する。

第 1 の DNA プローブ (配列番号 1)

5' TCTCACACCAGCTGTCCCAAGACCGTTTGC 3'

第 2 の DNA プローブ (配列番号 2)

5' AATACAGGCATCCTTCACTACATTTTCCCT 3'

第 1 の DNA プローブは、上記の試料 DNA の 1383 塩基から 1927 塩基の間の塩基配列と同じ塩基配列を持つ DNA 断片 (第 1 の標的 DNA 断片) に相補結合するプローブ、第 2 の DNA プローブは、上記の試料 DNA の 199 塩基から 558 塩基の間の塩基配列と同じ塩基配列を持つ DNA 断片 (第 2 の標的 DNA 断片) に相補結合するプローブである。第 3 の DNA プローブ 15, 第 4 の DNA プローブ 16 は上記の試料 DNA の塩基配列の何れの部位にも相補結合しない DNA プローブの例である。

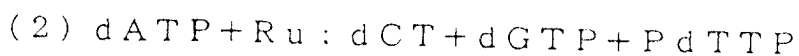
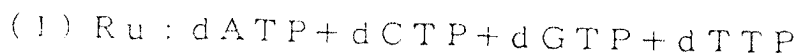
各 DNA プローブの 5' 末端に導入されたチオール基により、文献 (*Biophysical Journal* 71, 1079-1086 (1996)) に記載の方法により、第 1 の DNA プローブ 13 は作用電極の 111 の区

画3に、第2のDNAプローブ14は作用電極の111の区画4に、第3のDNAプローブ15は作用電極の111の区画5に、第4のDNAプローブ16は作用電極の111の区画6に、各々固定する。

第1図に示すDNA検出セル下基板11とDNA検出セル上基板12との間(DNA検出セル)に、測定対象のDNA断片群を含む試料溶液を入れ、DNAプローブとDNA断片を相補鎖結合させる。

第2図は、DNA検出セルの区画3に固定された第1のDNAプローブ13と第1の標的DNA断片21の一部の塩基配列との相補鎖結合によるハイブリッドを示す図である。第2図に図示しないDNA検出セルの区画4に固定された第2のDNAプローブ14と第2の標的DNA断片22の一部の塩基配列との相補鎖結合によるハイブリッドが形成される。ハイブリッドの形成後、洗浄液を用いて結合していないDNA断片をDNA検出セルの外部に排出する。

次に、標的DNA断片21に相補鎖結合した第1のDNAプローブ13の伸長反応を行なう。伸長反応では、リンカーを介してルテニウム錯体を結合したdNTP (N=A, C, G, T) (Ru: dNTPと略記)の少なくとも1つ含む基質混合液を使用する。第3図に示すように、Ru: dATPでは、リンカーとペプチド結合を介してアデニンの7位の窒素原子にルテニウム錯体が結合している。第4図に示すように、Ru: dCTPでは、リンカーとペプチド結合を介してシトシンの5位の炭素原子にルテニウム錯体が結合している。第5図に示すように、Ru: dGTPでは、リンカーとペプチド結合を介してグアニンの7位の窒素原子にルテニウム錯体が結合している。第6図に示すように、Ru: dTTPでは、リンカーとペプチド結合を介してチミンの5位の炭素原子にルテニウム錯体が結合している。なお、リンカーは、 $-(CH_2)_n-$ であり、 $n=2\sim 20$ である。伸長反応に使用する基質混合液の組成の例として以下の組成の何れかが可能である。



- (3) dATP+dCTP+Ru : dGTP+dTTP
- (4) dATP+dCTP+dGTP+Ru : dTTP
- (5) Ru : dATP+Ru : dCTP+dGTP+dTTP
- (6) Ru : dATP+dCTP+Ru : dGTP+dTTP
- (7) Ru : dATP+dCTP+dGTP+Ru : dTTP
- (8) dATP+Ru : dCTP+Ru : dGTP+dTTP
- (9) dATP+Ru : dCTP+dGTP+Ru : dTTP
- (10) dATP+dCTP+Ru : dGTP+Ru : dTTP
- (11) dATP+Ru : dCTP+Ru : dGTP+Ru : dTTP
- (12) Ru : dATP+dCTP+Ru : dGTP+Ru : dTTP
- (13) Ru : dATP+Ru : dCTP+dGTP+Ru : dTTP
- (14) Ru : dATP+Ru : dCTP+Ru : dGTP+dTTP
- (15) Ru : dATP+Ru : dTTP+Ru : dGTP  
+Ru : dCTP

第1の実施例では上記の組成(4)を使用し、2.5mMのdATP、dCTP、dGTP、Ru : dTTPを各々含む基質混合液2 $\mu$ L(マイクロリットル)をDNA検出セルに添加して、94℃での変成反応(10sec間)と66℃でのアニール反応(20sec間)を、1回から数回繰り返した後、72℃で伸長反応を行なう。

第7図は、第1の標的DNA断片21に相補鎖結合した第1のDNAプローブ13の伸長反応を説明する図である。第7図に図示しないが、第2の標的DNA断片22に相補鎖結合した第2のDNAプローブ14の伸長反応が、同様に起こる。24は未反応のRu : dTTPであり、25は未反応のdATP、dCTP、dGTPの何れかである。伸長反応により、第1の標的DNA断片21に相補鎖結合した第1のDNAプローブ13が伸長する結果、Ru : dTTPが伸長鎖に取り込まれず、伸長鎖にdNTPが取り込まれた伸長部分27と、Ru : dTTPが伸長鎖に取り込まれた伸長部分26とからなる伸張鎖が形成される。従って、伸長反応により、少なくとも1分子の

Ru : d T T P が、第 1, 第 2 の DNA プローブの伸長鎖に取り込まれ、少なくとも 1 つのルテニウム錯体 2 3 が区画 3, 4 に捕捉される。伸長反応の後、洗浄液を用いて洗浄し未反応の基質を除去する。

Ru : d T T P は d N T P (N=A, C, G, T) と比較して巨大分子であり、d T T P に比較して伸張鎖への取り込みの反応率が低い、少なくとも最初の 1 分子の Ru : d T T P が伸張鎖に取り込まれるまでは伸長反応が起きる。第 3, 第 4 の DNA プローブ 1 5, 1 6 には標的 DNA 断片 2 1, 2 2 が相補鎖結合していないので伸長反応は起こらず、Ru : d T T P の伸張鎖への取り込みも生じない。従って、ルテニウム錯体 2 3 が区画 5, 6 に捕捉されることはない。即ち、第 1 の実施例では、特定の塩基配列を持つ標的 DNA 断片が、DNA 検出セルに固定された DNA プローブに相補鎖結合し、DNA プローブの伸長反応によりルテニウム錯体が結合した d N T P が伸長鎖に取り込まれ、特定の区画にルテニウム錯体が間接的に捕捉される。第 1 の実施例では、区画 3, 4 に間接的に捕捉されたルテニウム錯体 2 3 の量を測定して、DNA 断片群を含む溶液中の標的 DNA 断片 2 1 の有無を検出する。

ルテニウム錯体で標識した DNA プローブを用いる通常の DNA プローブ法では、標識化 DNA プローブが DNA 検出セル内部に特異的に吸着する問題があるが、本発明で用いる Ru : d T T P は、ルテニウム錯体で標識した DNA プローブと比較し分子量が小さく、非特異的な吸着が少なく非特異的な吸着に由来するバックグラウンドを小さくできる利点がある。

次に、区画 3, 4 に間接的に捕捉されたルテニウム錯体 2 3 の量の測定方法について説明する。まず、DNA 検出セルをアミン系還元剤を含む緩衝液で置換して、作用電極 1 1 1, カウンター電極 (1 1 3-1, 1 1 3-2; 又は 1 1 3) が形成された DNA 検出セルの内面を洗浄する。第 1 の実施例では、還元剤として 0. 1 8 m o l / L (リットル) のトリプロピルアミン (T P A) を含む 0. 3 0 m o l / L のリン酸緩衝液 (p H 6. 8) を用い、温度は 2 8 ° C とした。

次に、作用電極 111 とカウンター電極 (113-1, 113-2; 又は 113) の間に、作用電極 111 の側が正となるように電圧を印加する。印加電圧の最適値は、用いる還元剤の種類や緩衝溶液の種類等により異なる。第 1 の実施例では、電位差が 1.35 V となる様に印加した。電圧印加により電気化学発光反応に従って電気化学発光 (第 1 の実施例で使用するルテニウム錯体が関与する電気化学発光反応 (Ru : dTTP のルテニウム錯体の部分が、第 25 図の反応を起こす) により生じる電気化学発光の強度が最大となる発光波長は 620 nm である) が生じる。

電気化学発光の強度は、作用電極 111 の近傍に存在するルテニウム錯体の量に比例する。電気化学発光の強度の測定により、DNA プローブと標的 DNA 断片とのハイブリッドの有無を決定できる。

先に説明した、伸長反応に使用する基質混合液の組成の例 (1) ~ (15) に於いて、Ru : dNTP (N=A, T, G, C) の代わりに、リンカーを介してルテニウム錯体を結合した ddNTP (N=A, T, G, C) (Ru : ddNTP と略記) を用いた基質混合液の組成の例 (1') ~ (15') の何れかを使用しても良い。

- (1') Ru : ddATP + dCTP + dGTP + dTTP
- (2') dATP + Ru : ddCT + dGTP + PdTTP
- (3') dATP + dCTP + Ru : ddGTP + dTTP
- (4') dATP + dCTP + dGTP + Ru : ddTTP
- (5') Ru : ddATP + Ru : ddCTP + dGTP + dTTP
- (6') Ru : ddATP + dCTP + Ru : ddGTP + dTTP
- (7') Ru : ddATP + dCTP + ddGTP + Ru : dTTP
- (8') dATP + Ru : ddCTP + Ru : ddGTP + dTTP
- (9') dATP + Ru : ddCTP + dGTP + Ru : ddTTP
- (10') dATP + dCTP + Ru : ddGTP + Ru : ddTTP
- (11') dATP + Ru : ddCTP + Ru : ddGTP  
+ Ru : ddTTP

(12') Ru: ddATP + dCTP + Ru: ddGTP

+ Ru: ddTTP

(13') Ru: ddATP + Ru: ddCTP + dGTP

+ Ru: ddTTP

(14') Ru: ddATP + Ru: ddCTP + Ru: ddGTP

+ dTTP

(15') Ru: ddATP + Ru: ddTTP + Ru: ddGTP

+ Ru: ddCTP

基質混合液の組成(1')～(15')を使用する場合、DNAプローブの伸張反応では1分子のRu: ddNTPのみが伸張鎖に取り込まれる。従って、電気化学発光の強度の測定により、DNAプローブと標的DNA断片とのハイブリッドの量を定量的に決定できる。

上記の電気化学発光の検出には、作用電極111の各区画毎に分離して電気化学発光の強度を検出できる空間分解能を持つ光検出系を用いる。

第8図は、第1の実施例に於ける電気化学発光の検出系の例を示す図である。光ファイバー3a, 3b, 3c, 3dの一端を区画3, 4, 5, 6の各区画に1対1対応して配置して、光ファイバー3a, 3b, 3c, 3dの他端にアバランシェフォトダイオード(APD)等の高感度固体検出器33, 34, 35, 36を接続した光検出系を使用できる。区画3, 4, 5, 6に於いて生じる電気化学発光は光ファイバー3a, 3b, 3c, 3dを通りAPD33, 34, 35, 36に於いて光電変換され検出される。APDの出力はA/D変換器38によりデジタル変換され、データ処理装置39で処理され、検出された各区画での電気化学発光の強度から上記した原理に基づいて、DNA断片群に存在する標的DNA断片の種類を決定できる。決定された結果は、データ処理装置39の表示部(ディスプレイ)に表示される。

第9図は、ディスプレイに表示される表示の画面例を示し、画面には、使用したDNA検出セルの番号と、DNA検出セルに固定されているDNAプローブの種類数(区画数)と、各区画に固定されているDNAプローブの配



列No.と、DNAプローブと試料中のDNAとの反応の検査結果（+（陽性：試料中にDNAプローブと相補鎖を形成するDNAが存在する）、-（陰性：試料中にDNAプローブと相補鎖を形成するDNAが存在しない））とを表示し、検査結果が陽性の場合には、DNAプローブの塩基配列を表示する。第9図に示す例では、試料中に配列番号1、及び配列番号2のDNAプローブと相補結合する塩基配列を持つDNAが検出されたことを示す。

第1の実施例の説明では、簡単のために4つの区画を持つDNA検出セルを例にとったが、実際の検査装置で使用されるDNA検出セルの区画の数は、例えば、第2の実施例で説明するように、 $100 \times 100 = 10000$ 個とする。区画の数は検査の目的に応じて適宜選ばれる。

なお、ルテニウム錯体標識の代わりに、オスミウム錯体等の他の電気化学発光反応に使用される標識を用いることも可能である。例えば、第1の実施例に於いて、Ru:dTTP、Ru:ddTTPに代えて、Os:dTTP、Os:ddTTPを使用する。

#### （第2の実施例）

DNA検出セルを高集積化して作成し、1度に取り扱うDNAプローブの種類を増加した場合（即ち、DNA検出セルの区画数を増加した場合）、電気化学発光を高感度TVカメラ等の2次元撮像装置により検出する方法が有効である。DNA検出セルの作用電極の近傍に於ける電気化学発光の分布を2次元画像として取り込み、画像処理により1度に多量のデータを処理できる。

第10図は、DNA検出セル41の作用電極111の近傍に於ける電気化学発光を、光学系42、及び複数の撮像素子40を持つTVカメラ43を用いて測定する検査装置の説明図である。作用電極111に対向して配置され、作用電極111と同じ面積を持つ透明なカウンター電極113と、作用電極111との間に電源44により印加される電圧と、電圧の印加の継続時間（第2の実施例では、0.4sec）は、電源制御装置45により制御される。光学系42は、通常の光学レンズを用いても良いが、イメージインテン

シファイア (1. 1.) 又はマイクロチャンネルプレート (MCP) を用いて光検出感度を増加させることが有効である。また、DNA 検出セルの高集積化に伴ない、より高い空間解像度が必要となる場合には、光ファイバー束を TV カメラ 43 の撮像面に直結する光学系を用いる。

第 2 の実施例の DNA 検出セルでは、 $20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$  の作用電極の面を、 $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$  の面積を持つ、 $x$ 、 $y$  方向に配置される  $100 \times 100 = 10000$  個の区画に分けて、各区画に異なる DNA プローブを固定している。約  $50\text{ nm} \times 50\text{ nm}$  の面積に DNA プローブの 1 分子を固定するものとして、 $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$  の面積を持つ各区画に約 1600 万分子 ( $0.027\text{ fmol}$ ) の DNA プローブが固定される。

ここで、標的 DNA 断片とハイブリット形成した DNA プローブの伸長反応により、DNA プローブの 1 分子当たり電気化学発光標識を結合した  $d\text{NTP}$  又は  $dd\text{NTP}$  が 1 分子だけ伸張鎖に取り込まれた場合を例にとる。作用電極と DNA セル上基板の距離を  $200\text{ }\mu\text{m}$  とした場合、1 区画 ( $200\text{ }\mu\text{m}$  立方) に約  $3.3\text{ nmol/L}$  の濃度の電気化学発光標識が間接的に捕捉される ( $0.027 \times 10^{-15}\text{ mol} / (200 \times 10^{-4}\text{ cm})^3 \approx 3.3\text{ nmol/L}$ )。

文献 (Clinical Chemistry 37, No. 9, 1534-1539 (1991)) の記載によれば、ルテニウムトリビビリジル錯体、TPA を使用する電気化学発光では、検出限界は  $200\text{ fmol/L}$  であるので、第 2 の実施例では、文献に記載の検出限界 ( $200\text{ fmol/L}$ ) の約 16500 倍の電気化学発光標識が 1 区画に存在することになる ( $3.3 \times 10^{-9} \div (200 \times 10^{-15}) \approx 16500$ )。

作用電極の面積が  $4\text{ mm} \times 5\text{ mm}$  である時、ルテニウムトリビビリジル錯体の濃度が  $10\text{ nmol/L}$  の溶液に於ける電気化学発光を  $0.4\text{ sec}$  間測定した場合に実験で実際に検出されたフォトン数は、作用電極  $1\text{ mm}^2$  当たり約 4000 フォトン ( $\text{CV} = 0.5\%$ ) であった。但し、実験で使用した装置では、電気化学発光を集光する光学系は使用しておらず、電気化学発

光の利用効率は、各区画の面積が光検出器であるPMTの受光面の面積に対してなす立体角と $2\pi$  (ster) との比と、PMTの量子効率（ここでは5%）との積で表わされ、約0.6%である。

従って、第2の本実施例に於ける、作用電極の面積 $20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$ を、面積 $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ の10000個の区画に分けたDNA検出セルを使用して、電気化学発光を集光するレンズのF値を0.65として、冷却型CCDカメラの量子効率を10%とすると、電気化学発光の利用効率は約0.7%であり、1区画当たりで0.4 sec間に検出されるフォトン数（電気化学発光量S）は、約50フォトンとなる（ $4000 / \{ (1000\text{ }\mu\text{m})^2 \times (10\text{ nmol/L}) \} \times \{ (200\text{ }\mu\text{m})^2 \times (3.3\text{ nmol/L}) \} \approx 52.8$ ）。電気化学発光量が電気化学発光標識（錯体）濃度に比例し、 $S/N$ が電気化学発光量（S）の平方根に比例すると仮定すると、第2の実施例に於ける測定での $S/N$ は約7となる。なお、実験で使用するDNA検出セルの構成を、作用電極の面積を $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ として、面積 $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ の2500個の区画をもつ構成として、上述のレンズ、冷却型CCDカメラを使用する時、電気化学発光の集光効率が約2倍となり、1区画当たりで0.4 sec間に検出されるフォトン数（電気化学発光量S）は、約100フォトンとなり、 $S/N$ は約10と改善される。以上の説明では、電気化学発光標識を結合したdNTP又はddNTPの1分子が1分子のDNAプローブの伸張鎖に取り込まれる場合についての $S/N$ であるが、電気化学発光標識を結合したdNTPのn分子が1分子のDNAプローブの伸張鎖に取り込まれる場合には、 $S/N$ は上記の値の $\sqrt{n}$ 倍となる。

光学系42にMCPを用い、2次元検出器として100万画素の冷却型CCDカメラを用いて、作用電極に於ける発光分布を撮影する。素子40に蓄積された信号電荷は電流又は電圧に変換され、A/D変換器38によりデジタル変換され、2次元デジタル画像を得る。得られた2次元デジタル画像は、データ処理装置39により2値化処理を行ない、発光の生じている

区画と発光の生じていない区画に区別する。どの位置の区画にどの種類のDNAプローブが固定されているかの区画毎のプローブ情報と、測定の結果得られた発光情報（発光の有無、発光の強度）を対比して、試料中に存在しているDNA断片の種類を特定できる。

以上説明したように、100万画素の冷却型CCDカメラを使用して、10000種類のDNAプローブのと試料中の標的DNA断片との相補鎖結合の有無を、測定時間0.4secで検出できる。各区画で検出された電気化学発光の強度から第1の実施例で説明した原理に基づいて、DNA断片群に存在する標的DNA断片の種類と量を決定できる。

### （第3の実施例）

第11図は、櫛形の作用電極と櫛形のカウンター電極とを同一平面に形成したDNA検出セルの構成を示す図である。第11図は、作用電極を光検出手段の側より見た図である。第3の実施例では、作用電極52とカウンター電極53を同一平面に作成して、電気化学発光の利用効率を増加させる。櫛形の作用電極52には、破線51-1～51-7により複数に仕切られる区画が設けられる。区画（大きさ $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ ）の総数は第2の実施例と同様に、10000個である。櫛形の作用電極52の各歯と櫛形のカウンター電極53の各歯とが、一方向で交互に対向するように、櫛形の作用電極52と櫛形のカウンター電極53とがDNAセル下基板の面に形成される。

即ち、各区画の作用電極52は、一方向でカウンター電極53（幅 $5\mu\text{m}$ ）を $5\mu\text{m}$ の間隙を挟んで配置されている。この配置により、各区画にほぼ均等の電圧が印加できるので、各区画から発生する電気化学発光の強度の総計には差が出ない。第3実施例では、DNAセル下基板に対応するDNAセル上基板に、カウンター電極を設ける必要が無いため、電気化学発光の伝搬を遮断しないので、電気化学発光の利用効率向上が可能となる。

なお、第3の実施例では、第2の実施例と同様の条件で作用電極52とカウンター電極53との間に電圧を印加する。電気化学発光の計測に要する時

間は0.4 secである。

(第4の実施例)

第12図は、作用電極と複数の独立したカウンター電極とを同一平面に形成したDNA検出セルの構成を示す図である。第4の実施例では、光検出手段の空間分解能を越えて区画を集積化したDNA検出セルの構成を説明する。第4の実施例のDNA検出セルの電極の配置構成は第3の実施例に類似するが、破線で仕切られる各区画(大きさ $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ )の総数は、第2の実施例と同様に、10000個であり、第12図では6区画のみを示す)の作用電極60は、一方向でカウンター電極(幅 $5\mu\text{m}$ )62-1, 62-2, 62-3を $5\mu\text{m}$ の間隙を挟んで配置されており、カウンター電極62-1, 62-2, 62-3に各々独立して電圧を印加できる構成が、実施例3の構成とは異なる。作用電極60は常に接地電位とし、切り換え器62-1S, 62-2S, 62-3Sを使用して、カウンター電極62-1, 62-2, 62-3に独立して、電源制御装置45と電源44により電圧を印加できる。

作用電極60には、破線で仕切られる区画61-1~61-6が設けられる。全てのカウンター電極の電位が0Vの場合、DNA検出セル内の溶液の電位は一様に0Vである。カウンター電極62-2を、0Vの電位から-1.4Vの電位に変化させると、溶液の電位の一様性が崩れ、カウンター電極62-2の近傍では溶液電位は0Vから負電位に引き下げられる。この溶液の負電位化は、時間と共にカウンター電極62-2から放射状に広がって行く。作用電極表面の溶液電位が負電位になると、溶液と作用電極間の電位差を反映するように作用電極面近傍に形成される電気二重層の電位分布が変化するが、電気二重層の電位分布の変化は溶液の負電位化の広がりとともに、矢印63, 64の方向に速度 $V_T$ で伝搬する。伝搬速度 $V_T$ は、溶液のイオン濃度、溶液温度、溶液と作用電極間の電位差等により異なるが、例えば、還元剤として $0.18\text{mol/L}$ のトリプロピルアミン(TPA)を含む $0.30\text{mol/L}$ のリン酸緩衝液(pH6.8)では約 $15\text{mm/sec}$ であった。

溶液と作用電極間の電位が $-1.1\text{ V}$ 以上と成るように電気二重層の電位分布が形成されると、Ru錯体とTPAとの間で電気化学発光反応が発生する。カウンター電極62-2より約 $1.5\text{ mm/sec}$ の速度で矢印63及び64の方向に発光領域が拡大して行く。

カウンター電極の中心部と区画の境界との距離を $d$ とする。カウンター電極62-2を負電位に設定した後、時間 $T = d/V_T$ が経過した時、カウンター電極62-2の電位の変化による作用電極面近傍に形成される電気二重層の電位分布の変化は、区画の境界まで達する。その結果、区画61-3と区画61-4のうち、電気化学発光標識が捕捉された区画では電気化学反応が起こり、電気化学発光が生じる。カウンター電極62-2を負電位に設定した後、時間 $T = d/V_T$ が経過した時に、カウンター電極62-2の電位を接地に戻すと、溶液-電極間の電位差の伝搬は消滅し、他の区画がカウンター電極62-2の影響で電気化学発光を生じることはない。同様に、他の何れかのカウンター電極を選択し、時間 $T$ だけ電位を与えた場合、選択されたカウンター電極を含む区画でのみ電気化学発光反応を励起できる。第4の実施例では、3つの区画を1つの光検出単位とする光検出系を用いる。

第13図は、複数の区画からの電気化学発光を集光して検出する光学系を説明する図である。区画の総数は、第2の実施例と同様に、10000個であり、第13図では6区画のみを示す。第13図では、区画61-1、61-3、61-5からの電気化学発光は光ファイバー71-1によりAPD72-1に集光され、区画61-2、61-4、61-6からの電気化学発光は光ファイバー71-2によりAPD72-2に集光され構成とする(10000区画からの電気化学発光の検出には、100個のAPDを必要とする)。切り換え器により、カウンター電極を1つずつ選択して負電位を与え、カウンター電極の選択に同期して、2つのAPDから光検出信号を読み出すことにより、2つのAPDにより6つの区画からの電気化学発光の測定が可能である。光ファイバー71-1、72-2の受光面は、各区画の面積より大であるが、カウンター電極の選択動作により、第4の実施例によれば、複数

の区画からの電気化学発光を1つの光検出系により、順次に測定することが可能であり、光検出系の総数より多い種類のプローブを有するDNA検出セルの評価が可能となる利点がある。

なお、第4の実施例では、カウンター電極を順次選択して切り換えた後に、作用電極60とカウンター電極62-1~62-3, ..., との間に電圧（例えば、-1.4V）を印加する。区画の大きさが、第2の実施例と同様に、 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ であり、伝搬速度 $V_T$ が約 $15\text{mm/sec}$ であるとする時、上記の電圧の印加の継続時間 $T$ は、 $(0.2\text{mm}/2)/15 = 0.0067\text{sec} = 6.7\text{msec}$ 以下であり、10000区画からの電気化学発光の検出に要する時間は、 $6.7\text{msec} \times 100 = 0.67\text{sec}$ となる。

#### （第5の実施例）

第14図は、集積化したDNA検出セルの区画からの電気化学発光を集光してTVカメラにより検出する場合のTVカメラの撮像面で観察される区画の大きさと撮像素子の大きさの関係を説明する図である。光検出手段としてTVカメラを用いることは、1度に多くの種類のDNAプローブを使用する多くの分画を持つDNA検出セルを使用する場合に有効である。第14図で斜線で示す作用電極111（DNAセル下基板11に形成される）にはx方向、及びy方向の破線により複数の区画（ $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の外形状を持つ）に分けられており、各区画の中央部にカウンター電極（一辺が $5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の正方形の外形状を持つ）が、数 $\mu\text{m}$ の間隙をおいて作用電極111（斜線部）に囲まれ作用電極に対向して配置される。即ち、カウンター電極が、作用電極111（斜線部）と分離して、DNAセル下基板12に形成される。各カウンター電極の中心と各区画の境界との距離を $h$ （ $=100\mu\text{m}$ ）とする。区画の総数は、第2の実施例と同様に、10000個であり作用電極の外寸法は $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ であり、第14図では16区画のみを示す。以下では、光検出手段、例えば、TVカメラの撮像面で観察される画像に於いて、第1の検出（撮像）素子の受光面積（空間分解能を規定す

る1因子) 81-1に合計4つの区画82-1~82-4からの電気化学発光が入射する場合を考える。

第15図は、カウンター電極がマトリックス状の配線により接続されDNAセル下基板に形成されるDNA検出セルの構成を示す図である。DNAセル下基板(電気絶縁材料)の面に第15図に示す配線及びゲートが形成され、次に絶縁層を介して第14図に示す作用電極及びカウンター電極が形成され、カウンター電極とゲートが電氣的に接続される。カウンター電極の総数は10000個であるが、第14図と同様に、第15図では16個のカウンター電極のみを示す。第15図に示すように、マトリクス配線は、各カウンター電極83-1~83-4に対応するTFTゲート91-1~91-4と、ゲート91-1と91-3に接続する導線92-1、ゲート91-2と91-4に接続する導線92-2、ゲート91-1と91-2のON/OFFを制御するゲート線93-1、ゲート91-3と91-4のON/OFFを制御するゲート線93-2で構成される。

第16図は、ゲート線(93-1, 93-2)及び導線(92-1, 92-2)の選択により、カウンター電極、即ち電気化学発光を誘起させる区画の選択を説明する図である。第14図、第15図に示すDNA検出セルでは、導線92-1を除く導線を0電位とし、導線92-1に負電位を印加した状態で、ゲート線93-1以外のゲート線をOFF電位(例えば、0電位)とし、ゲート線93-1を時間 $T = h/V_T$ の間隔だけON電位(例えば、10V以上)とすると、ゲート線93-1に接続するゲート91-1がON状態となり、導線92-1とカウンター電極83-1が導通する。その結果、カウンター電極83-1が時間Tの間だけ負電位になり、区画82-1だけで溶液-電極間の電位差が-1.4Vとなる様に電気二重層を形成できるため、区画82-1に電気化学発光標識が捕捉されている場合には電気化学発光反応がおきる。なお、第1~第4の撮像素子の受光面積81-1~81-4に於ける左上の区画(第14図では、簡単のために82-1のみに参照番号を付している)のカウンター電極に接続する全ての導線に負電位を印加し、



左上の区画のゲートに接続する全てのゲート線のON電位を印加すると、受光面積81-1～81-4に於ける左上の区画だけで選択的に電気化学発光を誘起させることができる。

以下、第16図に示すような、ゲート線及び導線の選択により、選択されるカウンター電極、即ち電気化学発光を誘起させる面（区画）を選択して、受光面積81-1～81-4の各々に属する各区画からの電気化学発光を1区画毎に順次検出できる。例えば、第1の撮像素子の受光面積81-1に属する4つの区画82-1～82-4からの電気化学発光を1区画毎に分離して順次検出できる。この結果、第5の実施例では、光検出手段の1検出素子の受光面積がDNA検出セルの1区画の面積よりも大であるにもかかわらず、1検出素子で検出できる区画の数が4となる。

なお、第5の実施例では、TVカメラの1検出（撮像）素子で、時間を切り換えて異なる4区画からの電気化学発光を検出する。即ち、10000区画からの電気化学発光を4回に分けて検出する。作用電極111とカウンター電極83-1～83-2，…，との間に電圧（例えば、-1.4V）を印加する。区画の大きさが、第2の実施例と同様に、 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ であり、伝搬速度 $V_T$ が約 $15\text{mm/sec}$ であるとする時、第4の実施例と同様に、上記の電圧の印加の継続時間 $T$ は、 $6.7\text{msec}$ 以下であり、10000区画からの電気化学発光の検出に要する時間は、 $6.7\text{msec} \times 4 = 26.8\text{msec}$ となる。

第5の実施例の以上の説明に於いて、TVカメラとして冷却型CCDカメラを使用する例について以下説明する。ここでは、100万素子からなる1インチ冷却型CCDカメラを使用する（CCDカメラの受光面でのCCD素子のサイズは $18\mu\text{m}$ 角である）。CCDカメラとDNA検出セルの間に配置される光学系の縮小率を約 $1/11$ とする。CCDカメラ等のTVカメラを使用する場合の空間分解能は、実際の見地から簡単に言うと、受光面での光検出素子の大きさを $L$ とする時、約 $2L$ となる。 $L = 18\mu\text{m}$ の場合には、CCD素子の4素子が、DNA検出セルの4区画からの電気化学発光を検出

する構成となるが、ここでは、上記で説明した方法と同様の方法により、4区画からの電気化学発光を分離して検出する構成とする。CCD素子の4素子は、第1の光検出開口（4素子で実効的な1素子を形成するという意味で使用する。第14図に示す81-1に対応する）を形成し、以下同様にして、その他の4素子により第2～第4の光検出開口81-2～81-4を形成する。CCD素子の4素子で光検出開口を形成するので、100万素子からなる1インチCCDカメラを使用する場合には、合計25万からなる光検出開口が形成される。先に説明したDNA検出セルの作用電極の大きさ20mmを200mmと大きくして、区画の数を100万個を形成して各区画に異なるプローブを固定しておく。100万素子からなる1インチCCDカメラを使用して、100万個の区画を持つDNA検出セルから発光する電気化学発光を検出するに要する時間は、先に説明した場合と同様に、26.8 msecである。

第5の実施例の構成によれば、DNA検出セルに形成する区画の数によらず、他の区画とは独立して、26.8 msecという短時間で計測が可能となる。また、CCD素子の複数素子で1光検出開口を形成して、1光検出開口が見込む複数の区画からの電気化学発光を、各区画毎に独立に高空間分解能で検出できる。

#### （第6の実施例）

第17図は、1つの選択された区画で繰り返し電気化学発光を生じさせる電圧印加の例を説明する図である。第6の実施例では、第4、及び第5の実施例に於いて、所定の緩和時間をおいた後に、カウンター電極に負電位を繰り返し印加して、再び電気化学発光反応を誘導する。カウンター電極に負電位を印加する時間T、及び周期tの1サイクルだけでは電気化学発光の強度が不十分で光検出手段の検出素子の検出感度に達しない場合には、所定の緩和時間をおいた後に、カウンター電極に負電位を繰り返し印加して電気化学発光反応を再誘導し、例えば、第17図に示すように、1つのカウンター電極に対して、周期tで電圧を複数回繰り返し印加して、光検出手段の検出素

子に蓄光して電気化学発光を検出する。電圧印加の制御は、電源制御装置 45 により電源 44 を制御して行なう。

例えば、第 5 の実施例に於いて、 $h = 100 \mu\text{m}$ ,  $V_T = 15 \text{ mm/sec}$  とする場合、電圧印加時間を  $T = 6.7 \text{ msec}$  となる。周期を  $t = 2T = 13.4 \text{ msec}$  とすると、印加電圧は  $75 \text{ Hz}$  の矩形波で制御すれば良い（上記の緩和時間は  $6.7 \text{ msec}$  となる）。この結果、電気化学発光反応の繰り返しによる電気化学発光の積分強度が得られ、1 サイクルだけでの電気化学発光の強度不足の問題（低検出感度、低  $S/N$ ）は解決できる。10000 個の区画を持つ DNA 検出セルを用いて、第 17 図に示す電圧の繰り返しを、 $n$  サイクルだけ行なう場合、電気化学発光の検出に要する計測時間は、第 4 の実施例では  $0.67 \times (2n) \text{ sec}$ 、第 5 の実施例では  $26.8 \times (2n) \text{ msec}$  となり、1 サイクルだけでの電気化学発光の強度の  $n$  倍の強度が得られ、 $S/N$  は  $\sqrt{n}$  倍向上する。例えば、 $n = 60$  とすると、計測時間は、 $80.4 \text{ sec}$ （第 4 の実施例）、 $3.2 \text{ sec}$ （第 5 の実施例）となる。

第 3 から第 6 の実施例に於いて、光検出手段により検出された信号は電流又は電圧に変換され、A/D 変換器 38 によりデジタル変換され、データ処理装置 39 で処理されることは、第 1、及び第 2 の実施例と同様である。

#### （第 7 の実施例）

第 1 の実施例～第 6 の実施例では、DNA 検出セルに固定する DNA プローブ 13, 14, 15, 16 は、2' - デオキシオリゴヌクレオシドの間にリン酸ジエステル結合を持つオリゴヌクレオチドである。第 9 の実施例では第 1 の実施例～第 6 の実施例に於いて、第 18 図に示すように、2' - デオキシオリゴヌクレオシドの間にホスホロチオエート（phosphorothioate）結合（参照番号 231）を持つオリゴヌクレオチドを DNA プローブ 13, 14, 15, 16 として使用し DNA 検出セルに固定する。第 18 図に示す B は核酸塩基（A, T, G, C の何れか）を表わす。ホスホロチオエート結合を持つ DNA プローブは、S1 ヌクレアーゼでは分解され

ない。

(第8の実施例)

第19図は、DNA検出セルを用いた検査装置の構成を示す図である。DNA検出セルは、凹部を持つ下基板241と、透明な上基板243とを持ち、下基板241の凹部の底面242には、第3の実施例(第11図)で説明したように、同一平面に作用電極とカウンター電極とが配置されている。DNA検出セルは、光学的に不透明なセルホルダー244に挿入され固定されている。上基板243に対向して、結像レンズ245と、結像レンズ245の結像位置に冷却型CCDカメラ246とが配置されている。CCDカメラ246を固定するカメラヘッド247は、光学的に不透明であり、セルホルダー244と接続して、DNA検出セル及び光学系への外光の入射を遮断している。DNA検出セルの作用電極とカウンター電極には、電源44が接続され、電源44による電圧印加と、CCDカメラ246に蓄積された信号の読み出しは、制御装置248により制御される。読み出された信号は、A/D変換器38によりデジタル変換され、データ処理装置39で処理され2次元デジタル画像としてメモリに保存される。なお、第19図の構成に於いて、カウンター電極の構成として、第1図(第1の実施例)、第10図(第2の実施例)、第12図(第4の実施例)、第14図(第5の実施例)の各図に示す構成を使用しても良い。

第20図は、結像レンズ245の側から見た第19図に示すDNA検出セルの平面図である。第8の実施例のDNA検出セルは、第2の実施例のDNA検出セルと同じ構成であり、 $20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$ の作用電極の面を、 $200\text{ }\mu\text{ m} \times 200\text{ }\mu\text{ m}$ の面積を持つ、 $100 \times 100 = 10000$ 個の区画に分けて、各区画に異なるDNAプローブが固定されている。

なお、以上の構成による第8の実施例では、第2の実施例と同様に電気化学発光の計測に要する時間は $0.4\text{ sec}$ である。

第2の実施例で説明したように電気化学発光を2次元デジタル画像として得る場合、又は第4、第5、第6の各実施例で説明したようにDNA検出

セルの集積度が光検出器の空間分解能を上回る場合には、DNA検出セルの区画の配列と光検出器の検出素子の配列とを精度良く合せる、又は電気化学発光の測定後に発光した各区画の位置を正確に求める等の必要が生じる。

DNA検出セルの区画の配列と光検出器の検出素子の配列との位置あわせを容易にするために、DNA検出セルに複数のマーカ―を設け、マーカ―の位置を利用してDNA検出セルと光検出器の位置関係を調整する。又は、電気化学発光を測定する際に同時に光マーカ―の位置を測定し、データ処理時にDNA検出セルと光検出器の位置関係を検出して、発光した各区画の位置を正確に求める。発光ダイオード等の微小面積の発光源をDNA検出セルに配置してマーカ―とするか、又はDNA検出セルにピンホールを設け、ピンホールを通過した光をマーカ―とする。DNA検出セルの特定の位置の区画をマーカ―に利用することもできる。

第20図に示す4つの区画251、252、253、254は、DNA検出セルのマーカ―として使用され、特別に作製された区画である。第2の実施例と同様に、1区画に固定されるDNAプローブの量が $0.027\text{ fmol}$ である場合、区画251に $0.0270\text{ fmol}$ 、区画252に $0.0203\text{ fmol}$ 、区画253に $0.0135\text{ fmol}$ 、区画254に $0.0068\text{ fmol}$ 、の既知の濃度のRu錯体を各々固定する。既知の濃度のRu錯体が固定された区画からの電気化学発光は、発光強度のスケールとして利用できる。

既知の濃度のRu錯体の固定を行なうには、DNA検出セルの作製時に予め固定する方法と、以下に説明する方法がある。例えば、予め区画251、252、253、254に、他の全てのDNAプローブと異なる塩基配列を持つプローブ（マーカ―プローブと呼ぶ）を上記既知の濃度で固定しておき、標的DNA断片と各区画のDNAプローブとを相補結合させる時に、マーカ―プローブとのみ相補結合するマーカ―DNAを添加し、マーカ―プローブとマーカ―DNAを相補結合させて、第1の実施例で説明したDNAプローブの伸張反応と同時に、マーカ―プローブの伸張反応を行なう。この方法で

は、マーカープローブの伸張鎖に取り込まれたRu:dNTP, 又はRu:ddNTPに基づく発光を測定することにより、相補結合、伸長反応が順調に行われたことを確認できる。

発光した区画のDNA検出セルに於ける位置は、以下の方法で求める。第20図に示す4つの区画251, 252, 253, 254からは常に電気化学発光が検出される。検出された2次元発光像の解析方法を以下に説明する。区画251, 252, 253, 254からの発光を含む2次元発光像が、参照番号255を原点とするxy座標により表わし、2次元発光像を形成する、x方向のPx個の画素数、y方向のPy個の画素数を求める。DNA検出セルは、100×100の区画から構成されているので、1区画当たりの画素数は、 $P_x / 100 = Q_x$ ,  $P_y / 100 = Q_y$ となる。発光した区画256の原点に近い角点257の座標を(Mx, My)を求め(画素数Mx, Myは画素数である)、 $I = [M_x / Q_x + 1]$ ,  $J = [M_y / Q_y + 1]$ を計算する([ ]は、[ ]内の値の小数第1位を四捨五入することを意味し、得られるI, Jは整数である)。この結果、発光した区画256は、DNA検出セルのJ行I列の区画であることがわかる。

第2の実施例では、電気化学発光を0.4sec間測定するが、第8の実施例では、同一区画からの電気化学発光を繰り返し測定する。

第21図は、繰り返し電気化学発光を生成する電圧印加の例を説明する図である。第21図に於いて、横軸は時間を示し、参照番号261はDNA検出セルの作用電極とカウンター電極との間に印加する電圧、参照番号262は電気化学発光標識からの発光量を示す。電圧を0.4sec間印加すると、電圧の印加と同時に電気化学発光が生じるが、使用する還元剤(第8の実施例ではTPA)が作用電極の表面及びその近傍で急激に消費され、発光量は急激に減少する。従って、電圧の印加時間を長くしても発光量の増加は期待できない。しかし、電圧の印加を停止して9.6secの緩和時間を設定すると、溶液中の還元剤が拡散により作用電極の表面及びその近傍に供給される。再び、電圧を0.4sec間印加すると、電気化学発光が生じる。0.

4 sec間の電圧の印加と、9.6 sec間の電圧の印加の停止とを繰り返すことにより（周期10 sec）、電気化学発光の総量を増加させることができ、検出感度の向上に有効である。なお、第21図に示す電圧の印加方法は、第2の実施例に限定されることなく、第1の実施例から第7の実施例の各実施例に適用でき、同様の効果が得られる。

（第9の実施例）

第1の実施例では、Ru:dNTP、又はRu:ddNTPを使用し、標的DNA断片に相補鎖結合したDNAプローブの伸長反応を行なうが、第7の実施例では、伸長反応を実行しない方法を採用する。予め、標的ポリヌクレオチド（標的DNA断片）21に電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド28を結合しておく。

第22図は、電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチドを結合した標的ポリヌクレオチドと相補鎖結合したDNAプローブを示す。電気化学発光の検出は第1から第6の各実施例で説明した方法による。

（第10の実施例）

第9の実施例では、電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチドを使用したが、標的ポリヌクレオチド（標的DNA断片）21の5'末端側に電気化学発光標識を結合しても良い。

第23図は、電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチドと相補鎖結合したDNAプローブを示す。電気化学発光の検出は第1から第6の各実施例で説明した方法による。

（第11の実施例）

第24図は、ポリヌクレオチド検査装置の検査手順を説明する図である。各実施例で説明したDNA検出セル（例えば、第1図に示すDNAセル下基板11とDNAセル上基板12により形成されるセル）に、測定対象のDNA断片群を含む試料溶液を入れる。次に、溶液の温度をハイブリダイゼーションに適する温度に設定し、DNAプローブとDNA断片とを相補鎖結合させる。DNAプローブとDNA断片との結合効率が最も良く、且つ非特異的

な結合を生じにくい温度条件を $55 \sim 65^{\circ}\text{C}$ の範囲で予め実験的に求めておき、設定する溶液の温度とする。相補鎖結合反応の後、 $0.05\%$  Tween 20を添加した $20\text{mM}$ リン酸緩衝液( $\text{pH}7.0$ )を洗浄液として用い、常温で結合していないDNA断片をDNA検出セルの外部に排出する。

次に、標的DNA断片に相補鎖結合したDNAプローブの伸長反応を行なう。伸長反応の後、洗浄液を用いてセルを洗浄し未反応の基質を除去し、電気化学発光試薬をセルに注入し、作用電極とカウンタ電極との間に電圧を印加して生じる電気化学発光を検出する。電気化学発光の検出の終了後、DNA検出セルの各区画に固定されたDNAプローブを遊離させ、DNA検出セルを再生する。DNA検出セルは、以下に説明する代表的な3つの方法で再生できる。

第1の再生方法では、DNA検出セルの各区画に固定されたDNAプローブを遊離させて完全に除去し、新たなDNAプローブを固定する。第1の方法では、試料の残留が殆ど無いため偽陽性が起こりにくい。

第2の再生方法では、 $95^{\circ}\text{C}$ の純水でDNA検出セルを洗浄して標的DNA断片をDNAプローブから遊離させ、標的DNA断片のみを検出セルから除去する。第2の方法では、短時間で簡単にDNA検出セルを再生でき、第9の実施例、第10の実施例に於いて有効である。

第3の再生方法は、第7の実施例に於いて有効である。第3の再生方法では、先ず、 $95^{\circ}\text{C}$ の純水でDNA検出セルを洗浄して、標的DNA断片をDNAプローブから遊離させ、DNA検出セルから除去する。この結果、DNA検出セルには、DNAプローブ(第7図に示す15)と、相補鎖合成による伸長部分(第7図に示す26, 27)を持つ1本鎖のDNAプローブが残る。次に、DNA検出セルにS1ヌクレアーゼを注入すると、S1ヌクレアーゼにより伸長部分26, 27はモノヌクレオチドに分解される。DNAプローブは、S1ヌクレアーゼにより分解されずにDNA検出セルに固定されまゝ残り、DNA検出セルは使用前の状態に再生される。第3の再生方法では、DNAプローブが再利用でき、DNA検出セル内に残留する可能性



のある標的DNA断片もS1ヌクレアーゼで分解でき、試料の残留が無いという特徴がある。

(配列表)

配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TCTCACACCCAGCTGTCCCAAGACCGTTTGC

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

AATACAGGCATCCTTCACTACATTTTCCCT

## 請求の範囲

1. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43, 72-1, 72-2, 246)とを有し、前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。
2. 前記電気化学発光標識が、ルテニウム錯体、又はオスミウム錯体であることを特徴とする請求の範囲第1項記載のポリヌクレオチド検査装置。
3. 前記光検出手段は、複数の前記区画からの前記電気化学発光を2次元像として検出する撮像手段(43, 266)であることを特徴とする請求の範囲第1項記載のポリヌクレオチド検査装置。
4. 前記第2の電極は複数の電極から構成され、前記複数の電極から所定の電極を選択する電極選択手段(62-1S~3S, 91-1~91-4)を具備し、前記電極選択手段により選択された前記電極と前記第1の電極との間に前記電圧を印加して、複数の前記区画から選択された所定の前記区画からの電気化学発光を検出することを特徴とする請求の範囲第1項記載のポリヌクレオチド検査装置。
5. 前記電極選択手段は、前記複数の電極の各電極に接続されるTFTゲート(91-1~91-4)を具備することを特徴とする請求の範囲第4項記

載のポリヌクレオチド検査装置。

6. 前記第1の電極と前記第2の電極とが交互に繰り返して一方向に平行に同一の面に配置され、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度と、交互に繰り返し配置される前記第1の電極の前記一方向に於ける中心線と前記第2の電極の前記一方向に於ける中心線との間の距離とに基づいて、前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有することを特徴とする請求の範囲第1項記載のポリヌクレオチド検査装置。

7. 前記電圧を繰り返し印加することを特徴とする請求の範囲第6項記載のポリヌクレオチド検査装置。

8. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43, 72-1, 72-2, 246)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

9. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記

電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段（33, 34, 35, 36, 43, 72-1, 72-2, 246）とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

10. 異なるDNAプローブ（13, 14, 15, 16）の種類毎に異なる区画（3, 4, 5, 6, 61-1～61-6, 82-1～82-4）に固定された第1の電極（111, 52, 60）と、前記第1の電極に対向する複数の第2の電極（113-1, 113-2, 53, 62-1～62-3, 83-1～83-4）とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段（62-1S～3S, 91-1～91-4）と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段（44）と具備し、電気化学発光標識が修飾された標的ポリヌクレオチドと前記DNAプローブとの相補鎖結合により捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを、前記電気化学発光標識から電気化学発光を前記電圧の印加により生じさせて、前記複数の区画から選択された区画毎に検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

11. 異なるDNAプローブ（13, 14, 15, 16）の種類毎に異なる区画（3, 4, 5, 6, 61-1～61-6, 82-1～82-4）に固定された第1の電極（111, 52, 60）と、前記第1の電極と同じ面に配置され前記第1の電極と分離され、前記区画毎の中心部に配置された複数の第2の電極（83-1～83-4）とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段（91-1～91-4）と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段（44）と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段（33, 34, 35, 36, 43, 72-1, 72-2, 246）とを具備し、前記選択された第2の電極の中心部と、前記選択された第2の電極が配置された前記区画に隣接する前記区画と境界との距離と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度とに基づいて、前記電圧を印加する時間を制御する手段（45）を有し、前記区画毎

に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

12. 前記複数の第2の電極は2方向に於いて等間隔に配置されることを特徴とする請求の範囲第11項記載のポリヌクレオチド検査装置。

13. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と、前記第1の電極と同一の面に配置される複数の第2の電極(53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(62-1S~, 62-3S, 91-1~91-4)と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43, 72-1, 72-2, 246)と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

14. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と、前記第1の電極に対向する複数の第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(62-1S~, 62-3S, 91-1~91-4)と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)とを具備し、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を前記複数の区画から選択された区画毎に検出して、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

15. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルの前記区画に固定された前記DNAプローブと、標的ポリヌクレオチド(21)とを相補鎖結合させて、前記標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張する工程と、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する工程と、前記電圧の印加により生じる電気化学発光の有無を検出して前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出する工程とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査方法。

16. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルの前記区画に固定された前記DNAプローブと、電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)とを相補鎖結合させて、前記標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加して、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する工程とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査方法。

17. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と前記第1の電極に対向する第2の電極(113-1, 113-2, 53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルの前記区画に固定された前記DNAプローブと、電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド(2

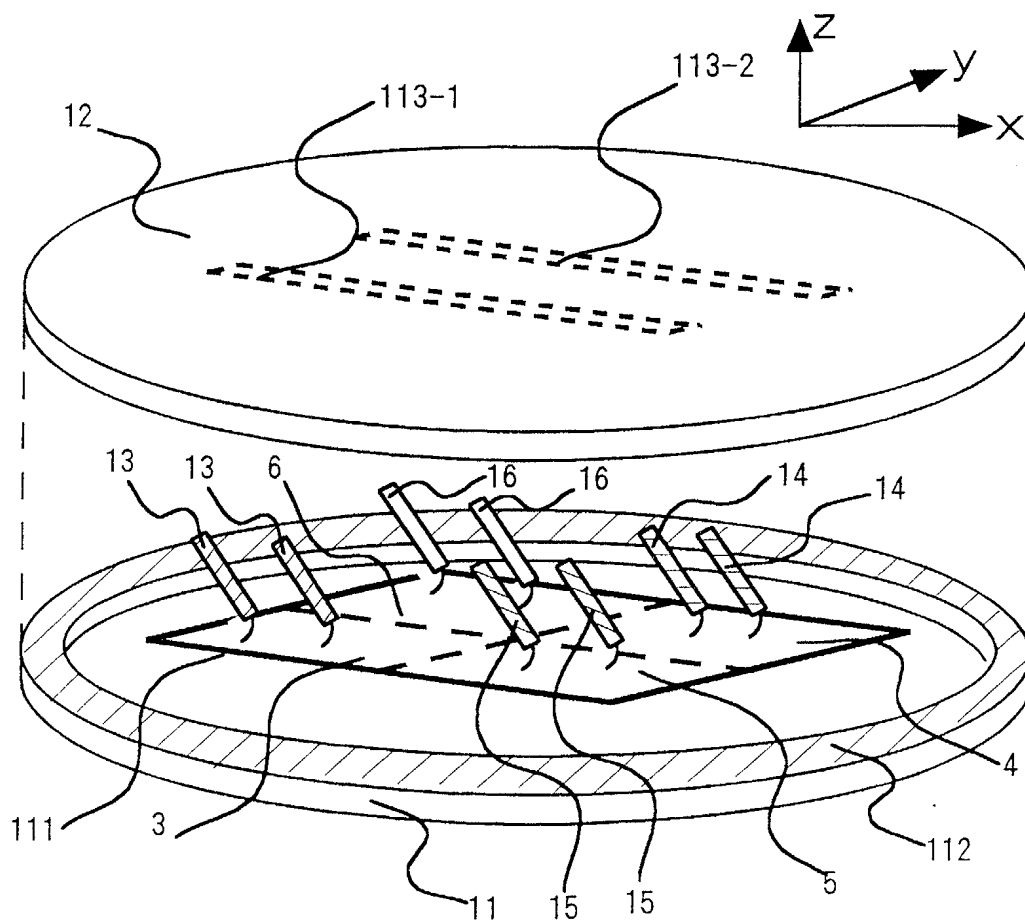
1) とを相補鎖結合させて、前記標的ポリヌクレオチドを捕捉する工程と、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加して、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する工程とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査方法。

18. 異なるDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6, 82-1~82-4)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と、前記第1の電極と同一の面に配置される複数の第2の電極(53, 62-1~62-3, 83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルの、前記複数の第2の電極から電極を選択する工程と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する工程と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する工程と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加して保持する時間長を制御する工程とを有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査方法。

19. 前記電気化学発光が生じる領域が拡大して、前記複数の第2の電極から選択された電極が配置された前記区画に隣接する前記区画に到達する迄に要する時間にほぼ等しい時間長にわたり、前記電圧が印加され保持されることを特徴とする請求の範囲第18項記載のポリヌクレオチド検査方法。

1 / 2 6

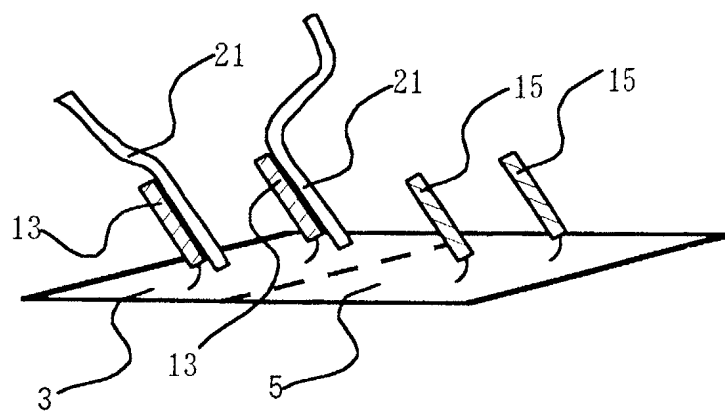
第 1 図





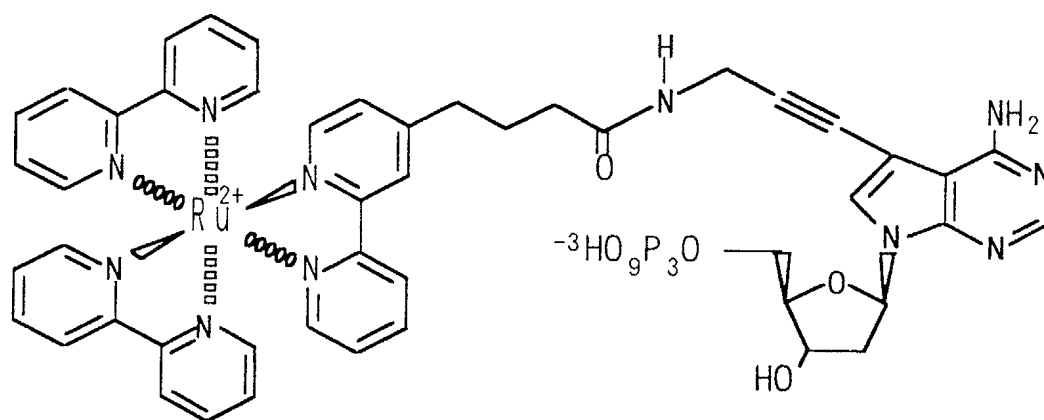
2 / 2 6

第 2 図



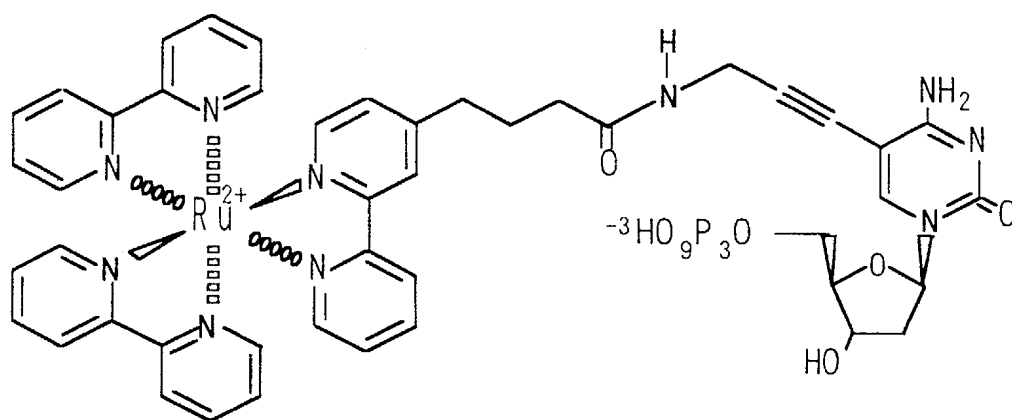
3 / 26

第3図



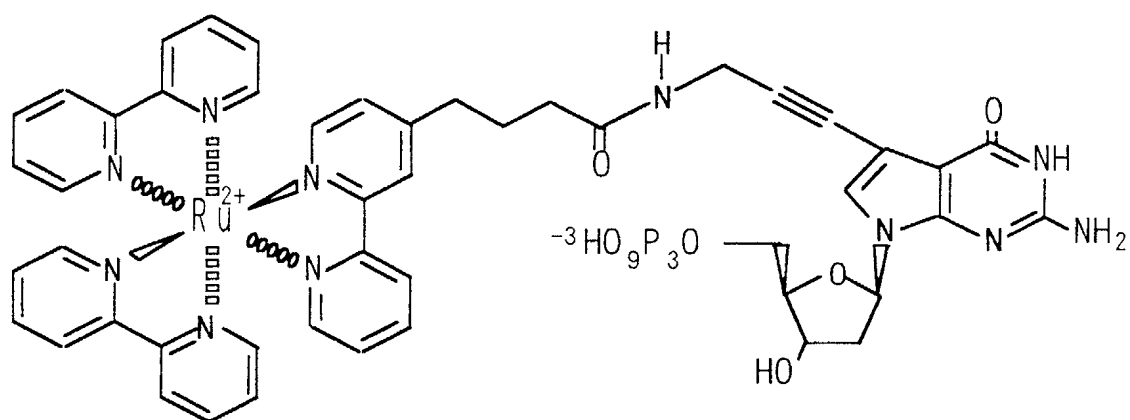
4 / 2 6

第 4 図



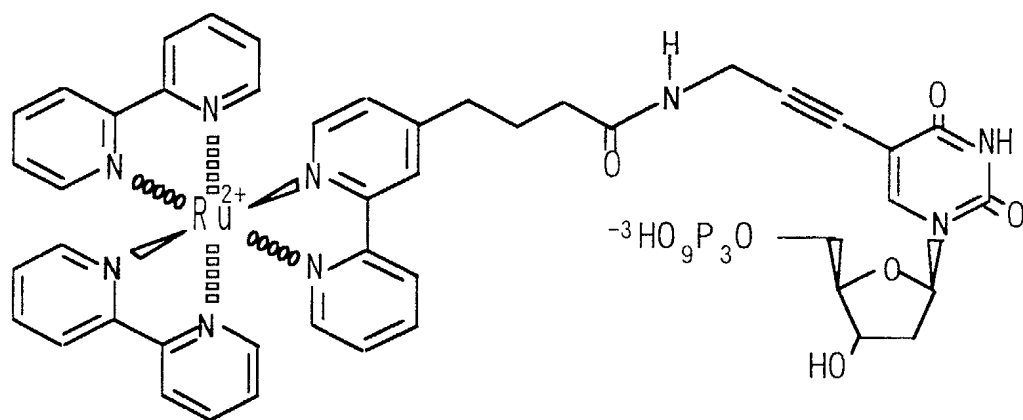
5 / 26

第5図



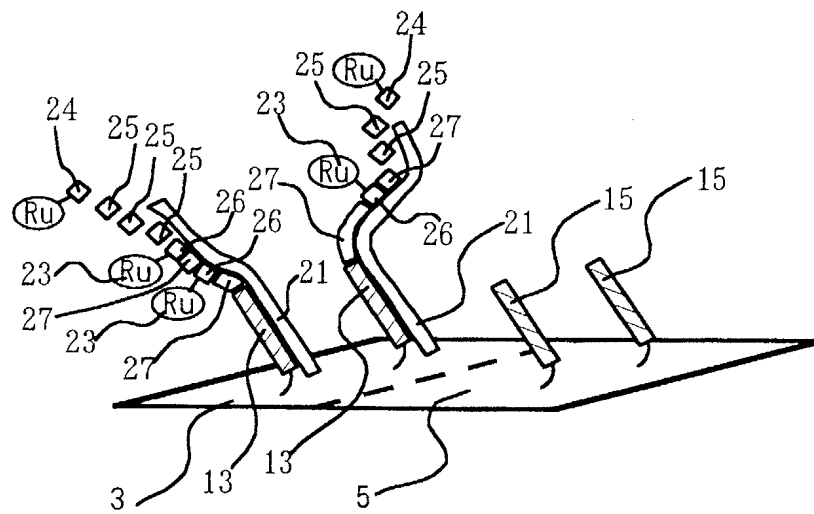
6 / 26

第6図



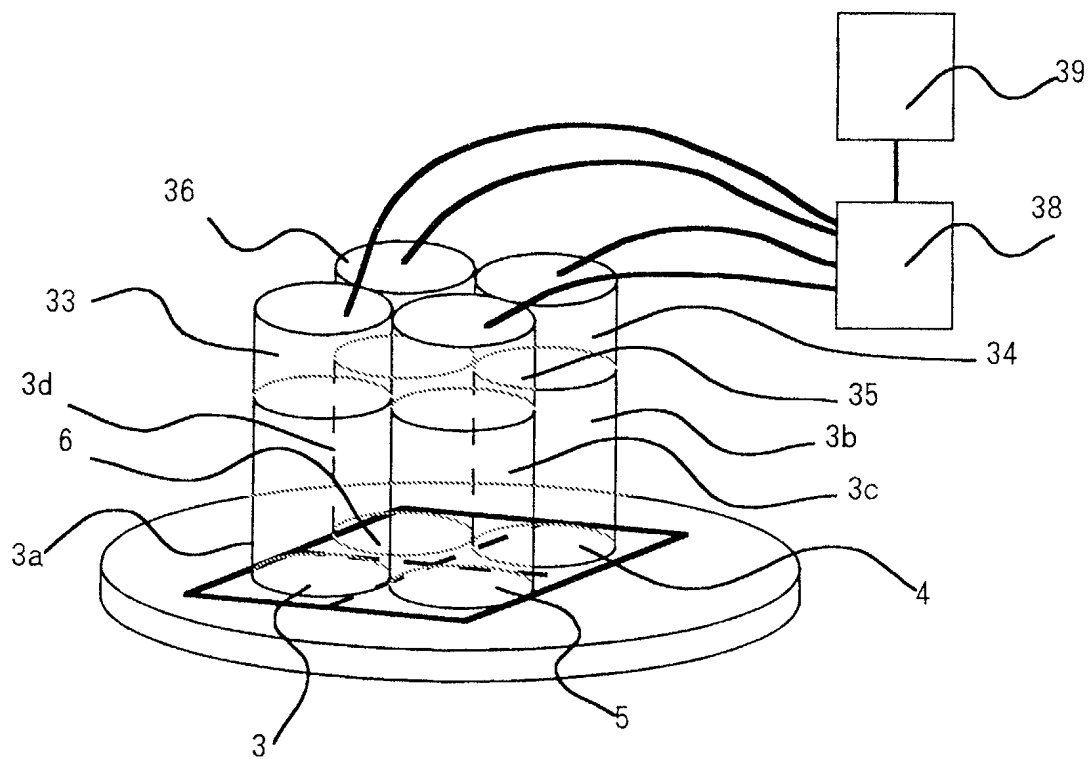
7 / 26

第7図



8 / 2 6

第 8 図



9 / 26

## 第9図

DNA検出セル番号=00001

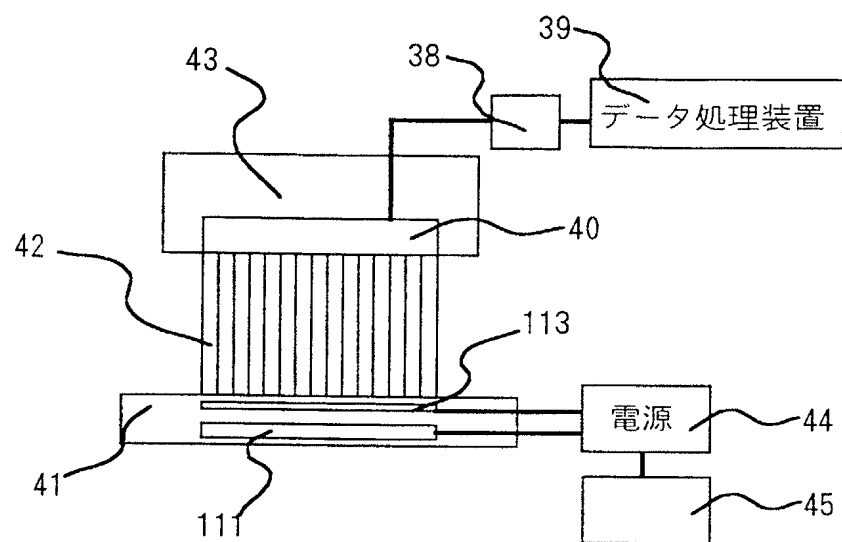
DNAのプロープ種類数=4

配列No.	結果	備考
1	+	TCTCACACCAGCTGTCCCAAGACCGTTTGC
2	+	AATACAGGCATCCTTCACTACATTTTCCCT
3	-	
4	-	



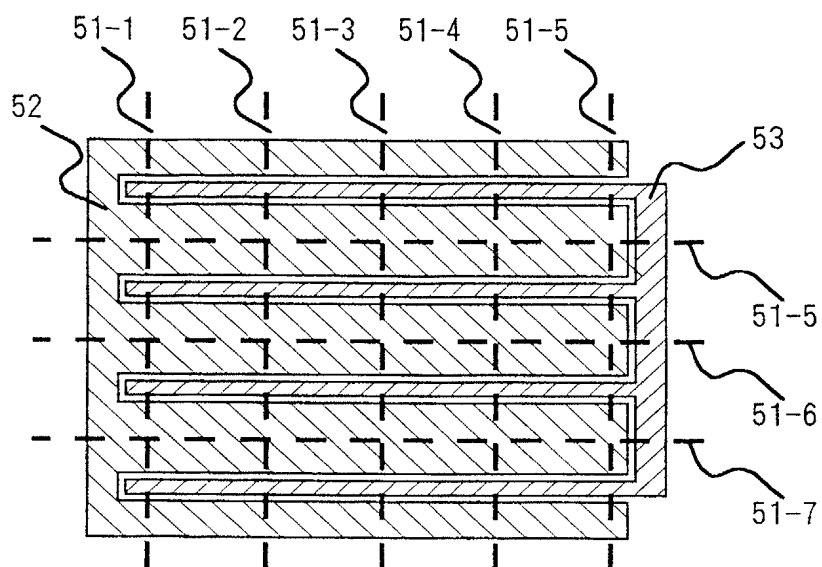
10/26

第10図



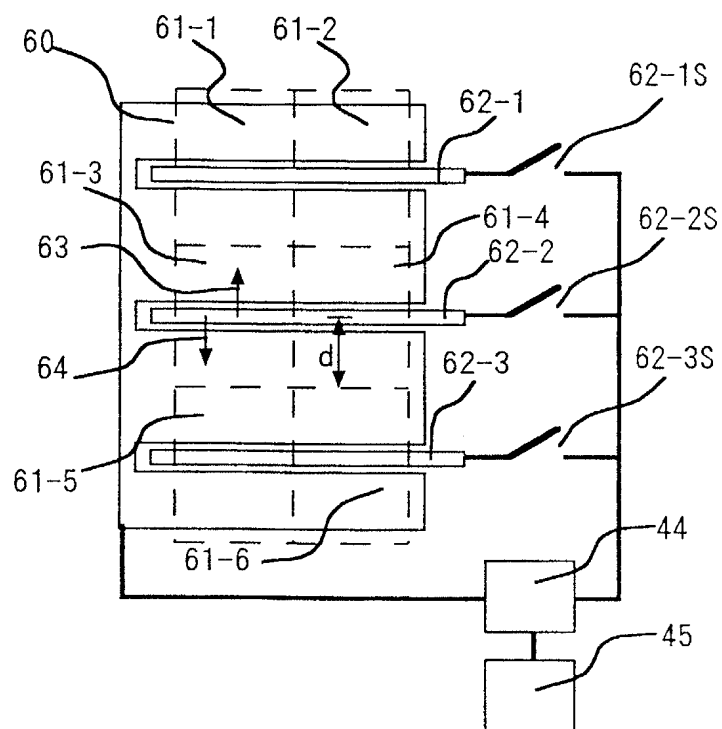
1 1 / 2 6

第 1 1 図



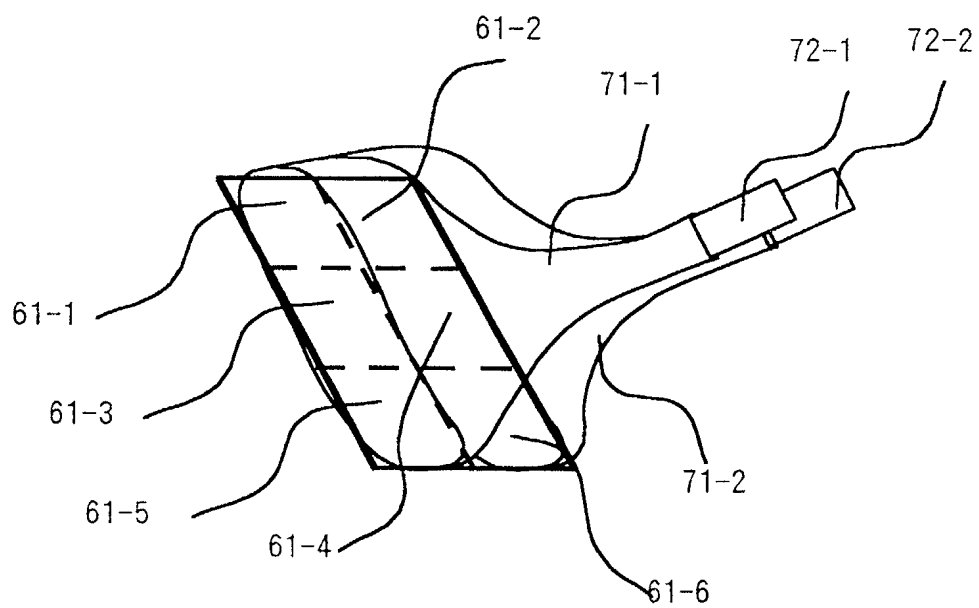
12 / 26

第 12 図



13/26

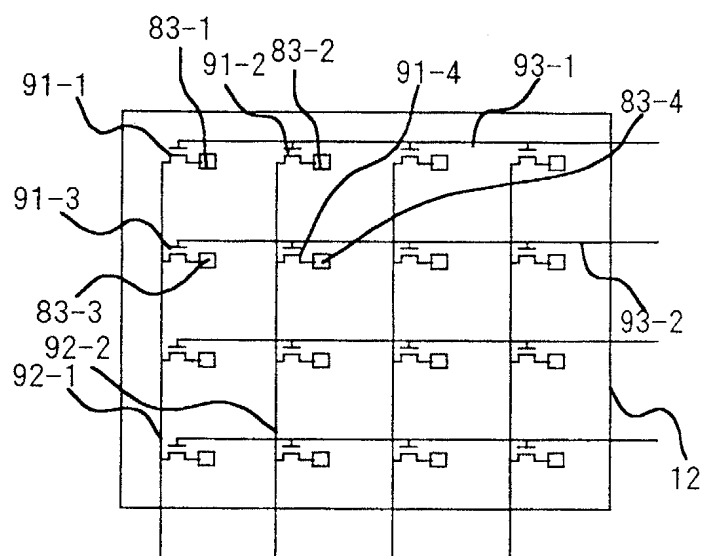
第13図





15 / 26

第15図



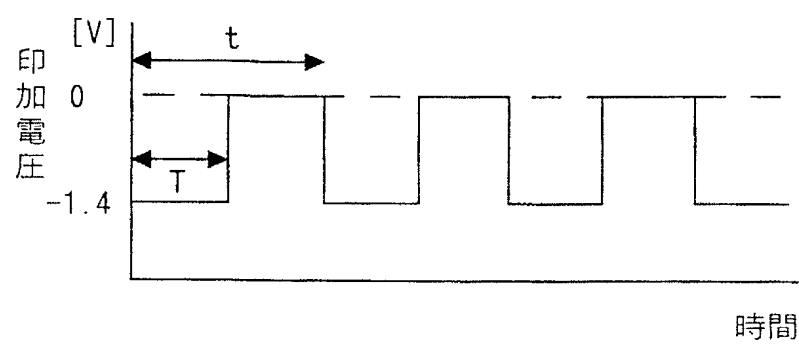
16 / 26

第16図

導線		ゲート線		選択される電極	発光する区画
92-1	92-2	93-1	93-2		
-V	0	ON電位	OFF電位	83-1	82-1
0	-V	ON電位	OFF電位	83-2	82-2
-V	0	OFF電位	ON電位	83-3	82-3
0	-V	OFF電位	ON電位	83-4	82-4

17 / 26

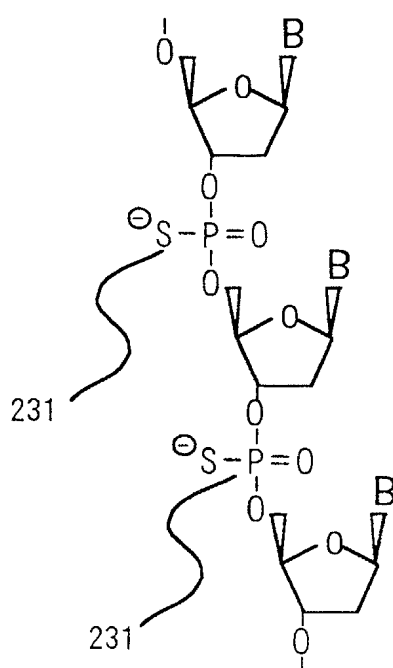
第 17 図





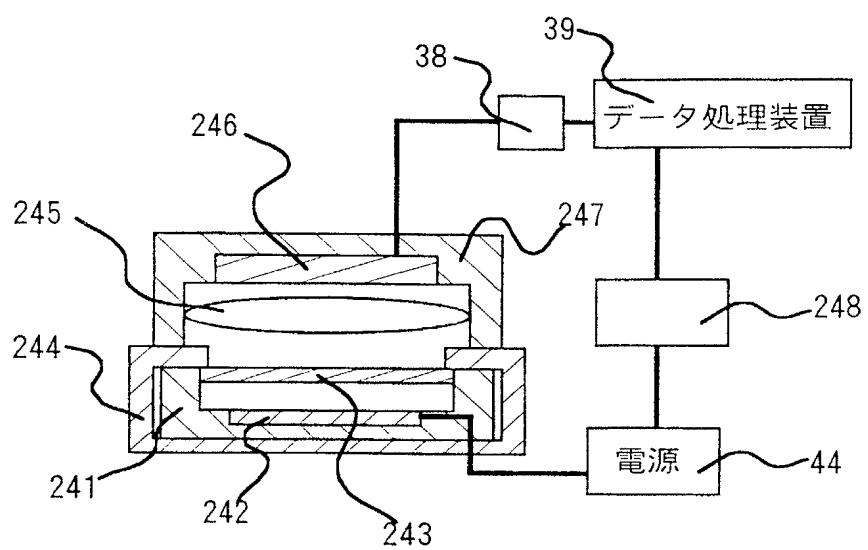
18 / 26

第18図



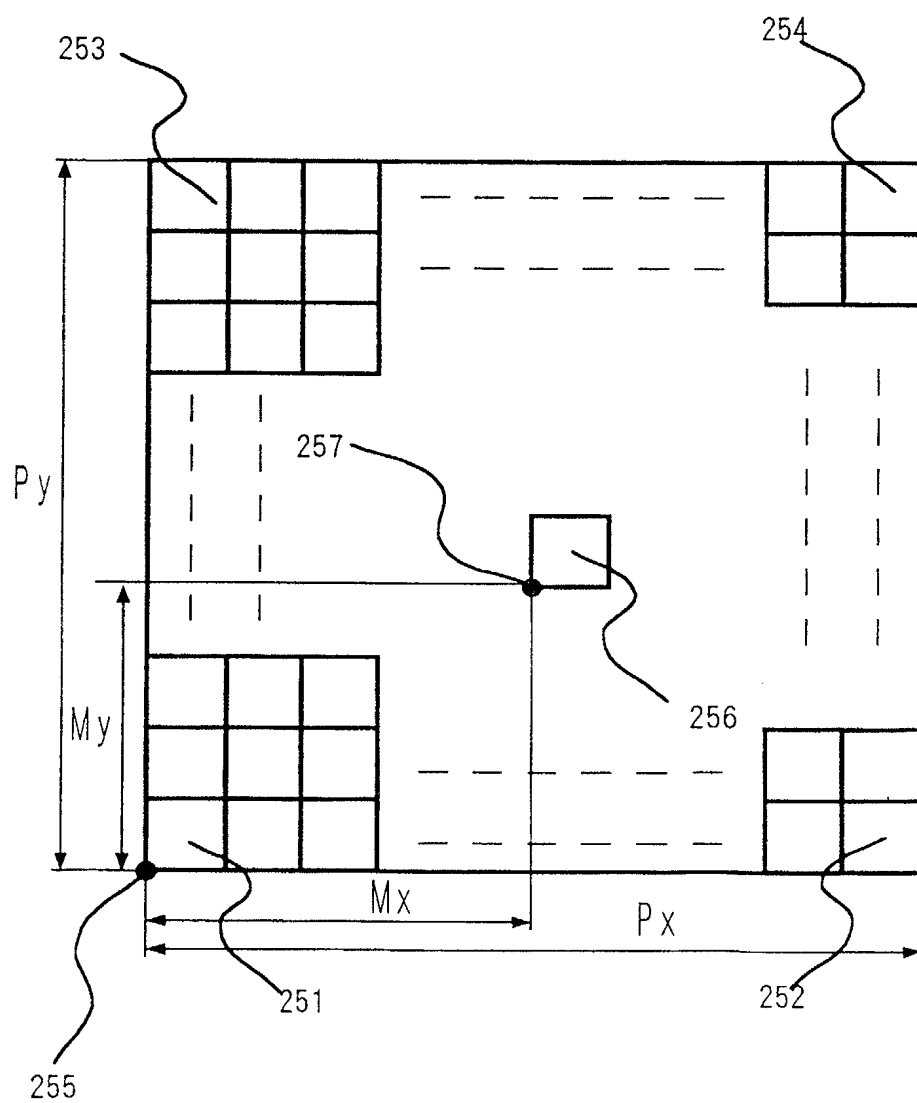
19 / 26

第 19 図



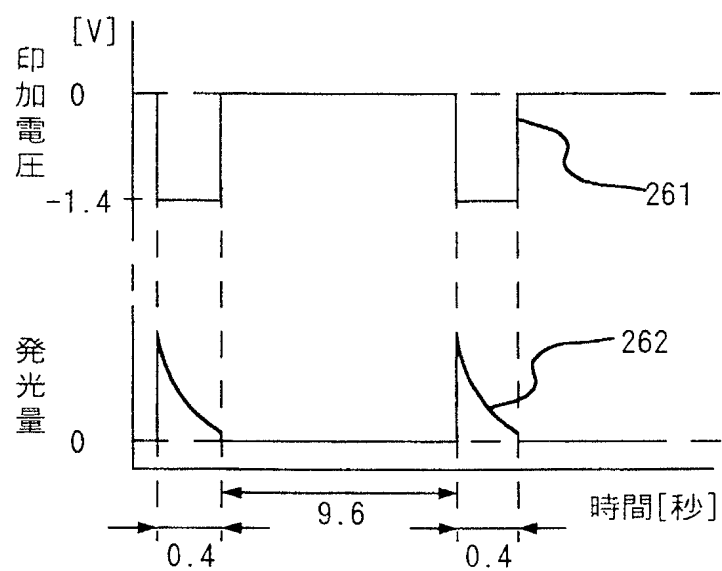
20 / 26

第20図



21 / 26

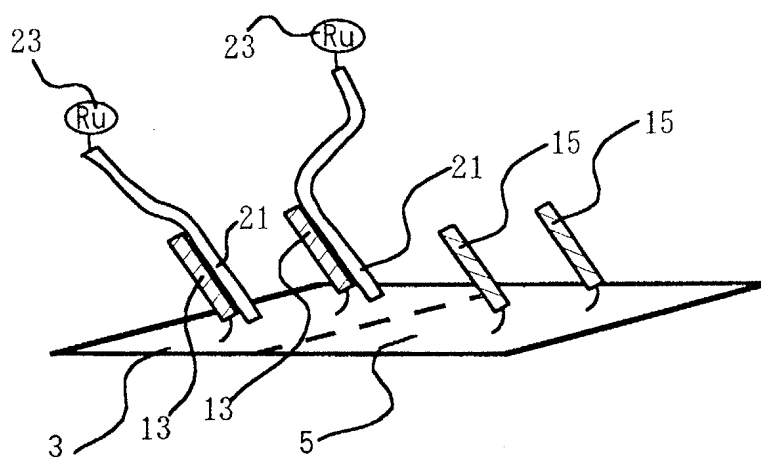
第21図





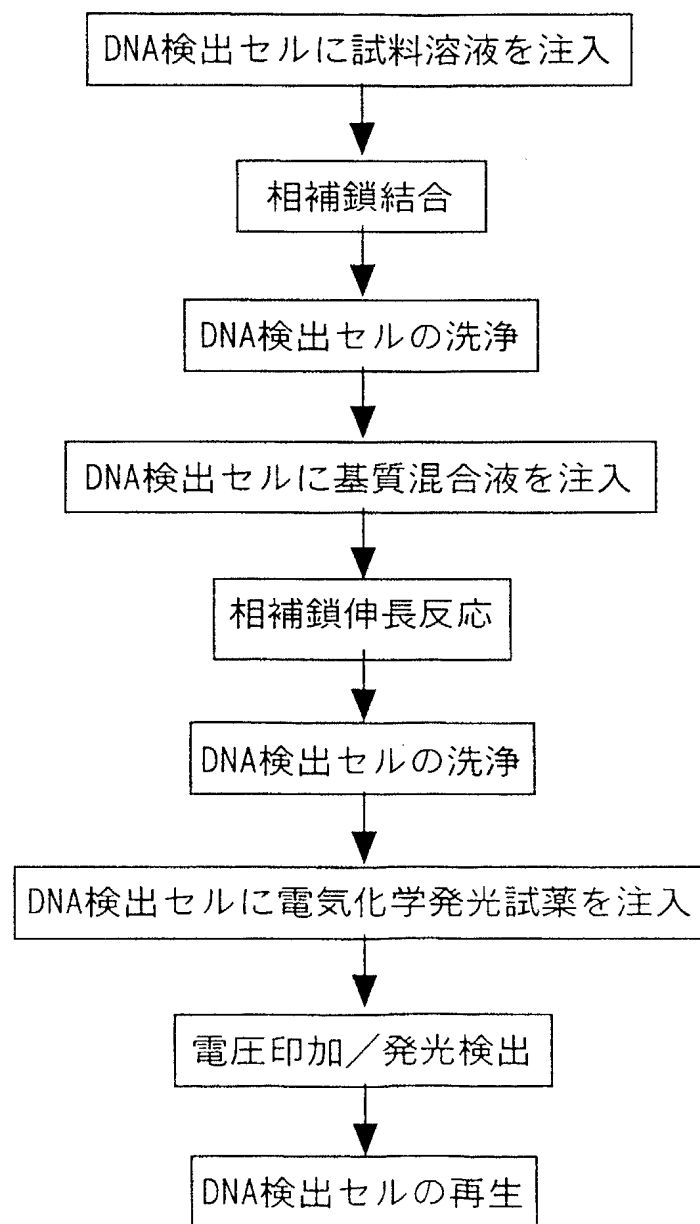
23 / 26

第 23 図



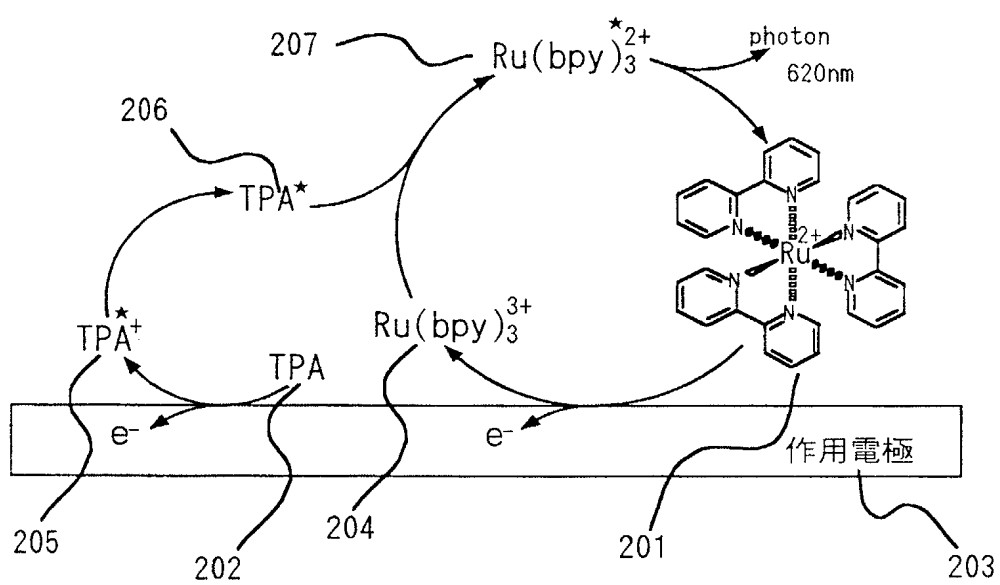
24 / 26

第24図



25 / 26

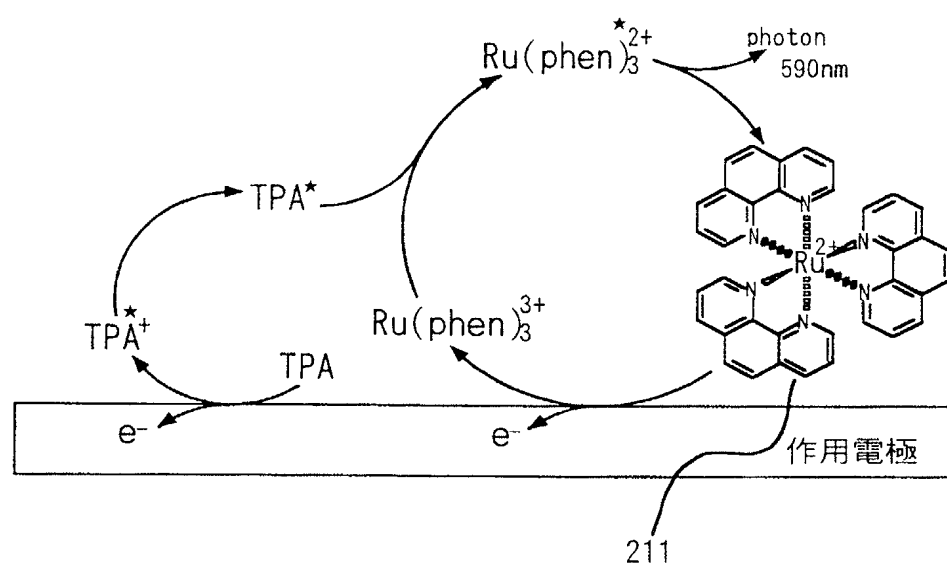
第25図





26 / 26

第 26 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02963

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO, 98/12539, A1 (Meso Scale Technologies, LLC), 26 March, 1998 (26. 03. 98) & ZA, 9708380, A	1-14/15-19
Y	JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.), 19 March, 1987 (19. 03. 87) & WO, 86/02734, A & EP, 199804, A & US, 5221605, A & US, 5238808, A & EP, 580979, A	1-19
Y	The Frontiers of PCR Process-From Fundamental Techniques to Application (in Japanese)", Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Vol. 41, No. 5, (April, 1996) p.494-502	15-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 1998 (29. 09. 98)Date of mailing of the international search report  
13 October, 1998 (13. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/12539, A1 (Meso Scale Technologies, LLC) 26.3月. 1998(26.03.98) & ZA, 9708380, A	1-14/ 15-19
Y	JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.) 19.3月. 1987(19.03.87) & WO, 86/02734, A & EP, 199804, A & US, 5221605, A & US, 5238808, A & EP, 580979, A	1-19
Y	蛋白質 核酸 酵素「PCR法最前線-基礎技術から応用まで」 第41巻, 第5号, (4月. 1996)p. 494-502	15-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.09.98

国際調査報告の発送日

13.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

37/1

20. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有し、前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

21. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

22. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113

37/2

－1，113－2）が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと，前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段（44）と，前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド（21）との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し，前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段（33，34，35，36，43）とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

23.（追加）DNAプローブ（13，14，15，16）が種類毎に異なる区画（82－1～82－4）に固定された第1の電極（111）と，前記第1の電極と同じ面に配置され前記第1の電極と分離され，前記区画毎の中心部に配置され，2方向に於いて等間隔に配置された複数の第2の電極（83－1～83－4）とを具備するポリヌクレオチド検出セルと，前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段（91－1～91－4）と，前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段（44）と，前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段（43，246）とを具備し，前記選択された第2の電極の中心部と，前記選択された第2の電極が配置された前記区画に隣接する前記区画と境界との距離と，前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度とに基づいて，前記電圧を印加する時間を制御する手段（45）を有し，前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

24.（追加）DNAプローブ（13，14，15，16）が種類毎に異なる区画（3，4，5，6，61－1～61－6）に固定された第1の電極（111，52，60）と，前記第1の電極と分離して前記第1の電極と同一の面に配置され，一方向に沿って前記第1の電極の一部にそれぞれ平行に配置された複数の第2の電極（62－1～62－3）とを具備するポリヌクレオチド検出セルと，前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段（62－1S～，62－3S）と，前記第1の電極と前記選択された電極

37/3

との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(72-1, 72-2)と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

25. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有し、前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

26. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的の

37/4

リヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

27. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

28. (追加) ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(82-1~82-4)に固定された第1の電極(111)と、前記第1の電極と同じ面に配置され前記第1の電極と分離され、前記区画毎の中心部に配置され、2方向に於いて等間隔に配置された複数の第2の電極(83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段

(91-1~91-4)と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(43, 246)とを具備し、前記選択された第2の電極の中心部と、前記選択された第2の電極が配置された前記区画に隣接する前記区画と境界との距離と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度とに基づいて、前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

37/5

29. (追加) ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と, 前記第1の電極と分離して前記第1の電極と同一の面に配置され, 一方向に沿って前記第1の電極の一部にそれぞれ平行に配置された複数の第2の電極(62-1~62-3)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと, 前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(62-1S~, 62-3S)と, 前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と, 前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(72-1, 72-2)と, 前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し, 前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。



37/4

リヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

27. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

28. (追加) ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(82-1~82-4)に固定された第1の電極(111)と、前記第1の電極と同じ面に配置され前記第1の電極と分離され、前記区画毎の中心部に配置され、2方向に於いて等間隔に配置された複数の第2の電極(83-1~83-4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段

(91-1~91-4)と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(43, 246)とを具備し、前記選択された第2の電極の中心部と、前記選択された第2の電極が配置された前記区画に隣接する前記区画と境界との距離と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度とに基づいて、前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

37/5

29. (追加) ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61-1~61-6)に固定された第1の電極(111, 52, 60)と, 前記第1の電極と分離して前記第1の電極と同一の面に配置され, 一方向に沿って前記第1の電極の一部にそれぞれ平行に配置された複数の第2の電極(62-1~62-3)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと, 前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(62-1S~, 62-3S)と, 前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と, 前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(72-1, 72-2)と, 前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し, 前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02963

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y ✓	WO, 98/12539, A1 (Meso Scale Technologies, LLC), 26 March, 1998 (26. 03. 98) & ZA, 9708380, A	1-14/15-19
Y ✓	JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.), 19 March, 1987 (19. 03. 87) & WO, 86/02734, A & EP, 199804, A & US, 5221605, A & US, 5238808, A & EP, 580979, A	1-19
Y ✓	The Frontiers of PCR Process-From Fundamental Techniques to Application (in Japanese)", Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Vol. 41, No. 5, (April, 1996) p.494-502	15-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 1998 (29. 09. 98)Date of mailing of the international search report  
13 October, 1998 (13. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 319801448971	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/02963	International filing date (day/month/year) 01 July 1998 (01.07.98)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, G01N 21/76		
Applicant HITACHI, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 September 1998 (25.09.98)	Date of completion of this report 15 June 1999 (15.06.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/02963

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-31 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 1-19 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 20-29 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 29 January 1999 (29.01.1999)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1-26 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/02963

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	15-19	YES
	Claims	1-14,20-29	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-29	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1) The subject matter of claims 1-14 and 20-29 is disclosed in document 1 [WO, 98/12539, A1 (Meso Scale Technologies, LLC)...] cited in the ISR and is thus considered not to be novel.

Document 1 discloses a polynucleotide assay apparatus that 1) makes use of a) a first electrode for which different DNA probes are fixed to different compartments, and a second electrode, and b) a voltage application means that applies a voltage across the aforementioned electrodes, and 2) is such that the DNA probes fixed to the compartments of the first electrode are bound to the target polynucleotide by complementary strand binding, thus capturing the target polynucleotide, and then the electrochemiluminescence generated by the electrochemiluminescent label of the captured target polynucleotide upon applying a voltage is detected (see in particular page 17, line 29 to page 18, line 25; page 161, lines 1-7; page 161, line 12 to page 162, line 8).

Document 1 does not contain disclosures concerning carrying out a DNA probe elongation reaction using a nucleotide having an electrochemiluminescent label, but it is nevertheless considered that, when regarded as apparatus, there is no difference between the invention disclosed in document 1 and that disclosed in claim 1-14..

2) The subject matter of claims 1-29 does not appear to involve an inventive step in view of document 1 and document 2 [JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.)...], both of which were cited in the ISR.

Document 2 discloses a polynucleotide assay apparatus and a method for assaying polynucleotides using said apparatus, where said apparatus 1) makes use of a) a polynucleotide detection cell equipped with i) an electrode upon which DNA probes are fixed and ii) an electrode facing said electrode, and b) a voltage application means for applying a voltage across these two electrodes, and 2) is such that the fixed DNA probes are bound to the target polynucleotide by complementary strand binding, thus capturing the target polynucleotide, and then either a) the electrochemiluminescence generated by the electrochemiluminescent label of the captured target polynucleotide upon applying a voltage is detected, or else b) a DNA probe elongation reaction is carried out using a nucleotide having an electrochemiluminescent label, and the electrochemiluminescence generated by the extended nucleotide upon applying a voltage is detected. It is considered that it would be easy for a person skilled in the art to apply the method disclosed in document 1 to the apparatus of document 2, thus providing a number of compartments so that assaying with a number of DNA probes can be carried out simultaneously.

3) The subject matter of claims 15-29 does not appear to involve an inventive step in view of document 1 and document 3 [The Frontiers of the PCR Process – From Fundamental Techniques to Application, Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Vol. 41, No. 5, pages 494-502 (in Japanese)], both of which were cited in the ISR

As can be seen from the disclosures in document 3, methods that involve detecting a polynucleotide using a labeled DNA probe, and methods that involve labeling with a DNA probe, elongating said probe using a labeled nucleotide and then carrying out detection, were well known by the priority date for the present application.

It is considered that, when detecting a polynucleotide using the apparatus disclosed in document 1, it would be easy for a person skilled in the art to carry out the labeling of said polynucleotide following well-known methods such as those disclosed in document 3.

REC'D 02 JUL 1999

WIPO PCT

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 319801448971	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/02963	国際出願日 (日.月.年) 01.07.98	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社 日立製作所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

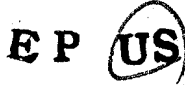
この附属書類は、全部で 5 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.09.98	国際予備審査報告を作成した日 15.06.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9452

PCT



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 319801448971	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/02963	国際出願日 (日.月.年) 01.07.98	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 株式会社日立製作所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
  - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
  - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
  - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。  


---
5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/12539, A1 (Meso Scale Technologies, LLC) 26.3月. 1998(26.03.98) & ZA, 9708380, A	1-14/ 15-19
Y	JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.) 19.3月. 1987(19.03.87) & WO, 86/02734, A&EP, 199804, A&US, 5221605, A&US, 5238808, A&EP, 580979, A	1-19
Y	蛋白質 核酸 酵素「PCR法最前線—基礎技術から応用まで」 第41巻, 第5号, (4月. 1996)p. 494-502	15-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.09.98

国際調査報告の発送日

13.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4 B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-31 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-19 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 20-29 項、 29.01.99 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-26 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	15-19	有
	請求の範囲	1-14, 20-29	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-29	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-29	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

1.) 請求の範囲1-14、20-29は、国際調査で引用された文献1(WO, 98/12539, A1(MESO SCALE TECHNOLOGIES, LLC)...)に記載されているので新規性を有しない。

文献1には、異なるDNAプローブが種類毎に異なる区画に固定された第1の電極と第2の電極と、前記電極に電圧を印加する電圧印加手段と、第1の電極の区画に固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合により結合させ、標的ポリヌクレオチドを捕捉し、捕捉された標的ポリヌクレオチドの電気化学発光標識の電圧の印加により生じる電気化学発光を検出するポリヌクレオチド検査装置が記載されている(特に、第17頁第29行~第18頁第25行、第161頁第1-7行、第12~第162頁第8参照)。

文献1には電気化学発光標識を有するヌクレオチドで、DNAプローブの伸張応を行うことについて記載されていないが、装置としては、文献1に記載されたものと、請求の範囲1-14に記載されたものの差が認められない。

2.) 請求の範囲1-29は、国際調査で引用された文献1及び文献2(JP, 62-500663, A(Hyperion Catalysis Int.)...)とにより進歩性を有しない。

文献2には、DNAプローブが固定された電極と、該電極に対向する電極とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記2つの電極との間に電圧を印加する電圧印加手段と、固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合により結合させ、標的ポリヌクレオチドを捕捉し、捕捉された標的ポリヌクレオチドの電気化学発光標識の電圧の印加により生じる電気化学発光、又は、電気化学発光標識を有するヌクレオチドでDNAプローブの伸張反応を行い、その伸張されたヌクレオチドの電圧の印加により生じる電気化学発光を検出するポリヌクレオチド検査装置及び該装置を用いてポリヌクレオチドを検査する方法が記載されている。文献2の装置において、文献1に記載された方法を適用し、複数の区画を設けることにより同時に複数のDNAプローブについて検査できるようにすることは、当業者が容易になし得ることと認められる。

3.) 請求の範囲15-29は、国際調査で引用された文献1及び文献3(蛋白質核酸酵素「PCR法最前線—基礎技術から応用まで」第41号、第5号、第494-502頁)とにより進歩性を有しない。

文献3に記載されているように、ポリヌクレオチドを標識したDNAプローブを用いて検出する方法、及びDNAプローブで標識し、該プローブを標識したヌクレオチドで伸張させて検出する方法は、本願優先日当時、周知技術である。

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

## 第 V 欄の続き

文献1に記載された装置を用いてポリヌクレオチドの検出を行う際に、該ポリヌクレオチドの標識を、文献3に記載されるような周知の方法に従って行うことは、当業者が容易になし得ることと認められる。

REC'D 10 NOV 2000

WIPO PCT

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 319801448971	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/02963	国際出願日 (日.月.年) 01.07.98	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/68, G01N21/76		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社 日立製作所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で 5 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見CORRECTED  
VERSION

国際予備審査の請求書を受理した日 25.09.98	国際予備審査報告を作成した日 15.06.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  滝本 晶子	4 B 9 4 5 2
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-31 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 1-19 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 20-29 項、 29.01.99 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-26 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	15-19	有
	請求の範囲	1-14, 20-29	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-29	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-29	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

1.) 請求の範囲1-14、20-29は、国際調査で引用された文献1 (WO, 98/12539, A1 (MESO SCALE TECHNOLOGIES, LLC)...) に記載されているので新規性を有しない。

文献1には、異なるDNAプローブが種類毎に異なる区画に固定された第1の電極と第2の電極と、前記電極に電圧を印加する電圧印加手段と、第1の電極の区画に固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合により結合させ、標的ポリヌクレオチドを捕捉し、捕捉された標的ポリヌクレオチドの電気化学発光標識の電圧の印加により生じる電気化学発光を検出するポリヌクレオチド検査装置が記載されている (特に、第17頁第29行～第18頁第25行、第161頁第1-7行、第161頁第12～第162頁第8行参照)。

文献1には電気化学発光標識を有するヌクレオチドで、DNAプローブの伸張応を行うことについて記載されていないが、装置としては、文献1に記載されたものと、請求の範囲1-14に記載されたものの差違が認められない。

2.) 請求の範囲1-29は、国際調査で引用された文献1及び文献2 (JP, 62-500663, A (Hyperion Catalysis Int.)...) とにより進歩性を有しない。

文献2には、DNAプローブが固定された電極と、該電極に対向する電極とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記2つの電極との間に電圧を印加する電圧印加手段と、固定されたDNAプローブと標的ポリヌクレオチドとを相補鎖結合により結合させ、標的ポリヌクレオチドを捕捉し、捕捉された標的ポリヌクレオチドの電気化学発光標識の電圧の印加により生じる電気化学発光、又は、電気化学発光標識を有するヌクレオチドでDNAプローブの伸張反応を行い、その伸張されたヌクレオチドの電圧の印加により生じる電気化学発光を検出するポリヌクレオチド検査装置及び該装置を用いてポリヌクレオチドを検査する方法が記載されている。文献2の装置において、文献1に記載された方法を適用し、複数の区画を設けることにより同時に複数のDNAプローブについて検査できるようにすることは、当業者が容易になし得ることと認められる。

3.) 請求の範囲15-29は、国際調査で引用された文献1及び文献3 (蛋白質核酸酵素「PCR法最前線—基礎技術から応用まで」第41号、第5号、第494-502頁) とにより進歩性を有しない。

文献3に記載されているように、ポリヌクレオチドを標識したDNAプローブを用いて検出する方法、及びDNAプローブで標識し、該プローブを標識したヌクレオチドで伸張させて検出する方法は、本願優先日当時、周知技術である。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

文献1に記載された装置を用いてポリヌクレオチドの検出を行う際に、該ポリヌクレオチドの標識を、文献3に記載されるような周知の方法に従って行うことは、当業者が容易になし得ることと認められる。



37/1

20. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有し、前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

21. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

22. (追加) 第1の電極(111)が形成され、DNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113

37/2

—1, 113—2) が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識された標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

23. (追加) DNAプローブ(13, 14, 15, 16) が種類毎に異なる区画(82—1～82—4) に固定された第1の電極(111)と、前記第1の電極と同じ面に配置され前記第1の電極と分離され、前記区画毎の中心部に配置され、2方向に於いて等間隔に配置された複数の第2の電極(83—1～83—4)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(91—1～91—4)と、前記第1の電極と前記選択された電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(43, 246)とを具備し、前記選択された第2の電極の中心部と、前記選択された第2の電極が配置された前記区画に隣接する前記区画と境界との距離と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度とに基づいて、前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

24. (追加) DNAプローブ(13, 14, 15, 16) が種類毎に異なる区画(3, 4, 5, 6, 61—1～61—6) に固定された第1の電極(111, 52, 60)と、前記第1の電極と分離して前記第1の電極と同一の面に配置され、一方向に沿って前記第1の電極の一部にそれぞれ平行に配置された複数の第2の電極(62—1～62—3)とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記複数の第2の電極から電極を選択する電極選択手段(62—1S～, 62—3S)と、前記第1の電極と前記選択された電極

37/3

との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記電圧の印加により電気化学発光標識から生じる電気化学発光を検出する光検出手段(72-1, 72-2)と、前記電気化学発光が生じる領域の拡大する速度に基づいて前記電圧を印加する時間を制御する手段(45)を有し、前記区画毎に捕捉された前記標的ポリヌクレオチドを検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

25. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポリヌクレオチドを捕捉し、電気化学発光標識した塩基(24)を用いて伸張反応を行ない相補鎖結合した前記DNAプローブを伸張し、前記電圧の印加により生じる電気化学発光を検出する光検出手段(33, 34, 35, 36, 43)とを有し、前記伸張反応により生成した伸張鎖(26)の有無を検出することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

26. (追加) 第1の電極(111)が形成され、ホスホロチオエート結合をもつDNAプローブ(13, 14, 15, 16)が種類毎に前記第1の電極の複数の区画(3, 4, 5, 6)に固定された第1の基板(11)と、前記第1の基板に対向して配置され、前記区画の複数に対向するように形成された複数の第2の電極(113-1, 113-2)が形成された第2の基板とを具備するポリヌクレオチド検出セルと、前記第1の電極と前記第2の電極との間に電圧を印加する電圧印加手段(44)と、前記区画に固定された前記DNAプローブと電気化学発光標識されたオリゴヌクレオチド(28)を結合した標的ポリヌクレオチド(21)との相補鎖結合により前記標的ポ

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

M.H.  
PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

13 January 2000 (13.01.00)

International application No.:

PCT/JP98/02963

Applicant's or agent's file reference:

319801448971

International filing date:

01 July 1998 (01.07.98)

Priority date:

Applicant:

KAJIYAMA, Tomoharu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

25 September 1998 (25.09.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38